

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年3月15日 (15.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/18223 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/86, 15/45 // A61K 31/7105, 48/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06051
- (22) 国際出願日: 2000年9月6日 (06.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/252231 1999年9月6日 (06.09.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 ディナベック研究所 (DनावEC RESEARCH INC.) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 永井美之 (NAGAI, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒150-0022 東京都渋谷区恵比寿南3丁目11番17号 原町住宅104号 Tokyo (JP). 加藤 篤 (KATO, Atsushi) [JP/JP]; 〒205-0023 東京都羽村市神明台2-5-33 神明台住宅807 Tokyo (JP). 長谷川 護 (HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP]; 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PARAMYXOVIRUSES HAVING MODIFIED TRANSCRIPTION INITIATION SEQUENCE

A1

(54) 発明の名称: 改変された転写開始配列を有するパラミクソウイルス

WO 01/18223 A1

(57) Abstract: Virus vectors of the family *Paramyxoviridae* in which the transcription initiation sequence has been modified and thus the expression of genes located downstream thereof has been modified; a process for producing the same; and use of the same. By measuring the transcription initiation efficiency of each gene carried by Sendai viruses, it is clarified that the transcription initiation sequence of F gene has a significantly lower ability to promote the transcription than the three other transcription initiation sequences. When the transcription initiation sequence of the F gene of wild type Sendai virus is substituted by the transcription initiation sequence of the P/M/HN genotype showing a high efficiency, the F gene of the resultant Sendai virus mutant and genes located downstream thereof show elevated expression doses. It is also found out that this mutant proliferates more quickly than the wild type. The above-described vectors are useful in producing medicinal compositions and vaccines.

[続葉有]



(57) 要約:

本発明は、転写開始配列の改変によりその下流の遺伝子群の発現が改変されたパラミクソウイルス科ウイルスベクター、並びにそれらの製造および用途を提供する。センダイウイルスが有する各遺伝子の転写開始配列の転写開始効率を測定したところ、F遺伝子の転写開始配列は、他の3つの転写開始配列に比べ、転写を促進する能力が有意に低いことが判明した。また、野生型センダイウイルスのF遺伝子の転写開始配列を、効率の高いP/M/HN遺伝子型の転写開始配列に置換したところ、この変異型センダイウイルスのF遺伝子およびその下流の遺伝子の発現量は増加し、野生型に比べ速く増殖することが判明した。本発明のベクターは、外来遺伝子の高発現のため、また、医薬品組成物およびワクチンの製造のために有用である。

明細書

改変された転写開始配列を有するパラミクソウイルス

技術分野

本発明は、転写開始配列が改変された組換えパラミクソウイルス科ウイルスに関する。

背景技術

パラミクソウイルスは非分節型ネガティブ鎖RNAをゲノムとして有する。ゲノムには6つの遺伝子がコードされており、各遺伝子には短い配列 (E-IG-Sシグナル) が共通して連結されている。これらのシグナルの配列の保存性は、属 (genus) および科 (family) 内で特に高く、同じ種 (species) に属するウイルスの遺伝子内ではきわめて高い (Feldmann, H. E. et al., 1992, Virus Res. 24:1-19)。

センダイウイルス (Sendai virus; SeV) はパラミクソウイルス科 (*Paramyxoviridae*) のレスピロウイルス (Respirovirus) に分類されている、エンベロープを持つ非分節型のネガティブ鎖RNAウイルスであり、パラミクソウイルス亜科 (*Paramyxovirinae*) の原型であると考えられている。SeVのゲノムサイズは15,384塩基で、3'の短いリーダー領域に続き、N (ヌクレオキャプシド)、P (ホスホ)、M (マトリックス)、F (フュージョン)、HN (ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ)、およびL (ラージ) 蛋白質をコードする6つの遺伝子が並んでおり、短い5'トレイラー領域を他端に有する。P蛋白質に加え、鋳型にないG残基が挿入される co-transcriptional editing (転写に共役したRNA編集) (Park, K.H. and M. Krystal, 1992, J. Virol. 66:7033-7039; Paterson, R.G., and R.A. Lamb, 1990, J. Virol. 64:4137-4145; Thomas, S.M. et al., 1988, Cell, 54:891-902; Vidal, S. et al., 1990, J. Virol. 64:239-246) および選択的翻訳開始機構 (Gupta, K.

C., and E. Ono, 1997, J. 321:811-818; Kuronati, A. et al., 1998, Genes Cells 3:111-124) により、第2の遺伝子がそれぞれアクセサリー蛋白質 VおよびC を発現する。ゲノムはN蛋白質と強く結合しており、ヘリカルナリボヌクレオプロテイン (RNP) 複合体を形成している。裸のRNAではなく、このRNPが転写および複製のための鋳型となる (Lamb, R.A., and D. Kolakofsky, 1996, *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. pp.1177-1204. In *Fields Virology*, 3rd edn. Fields, B. N., D. M. Knipe, and P. M. Howley et al. (ed.), Raven Press, New York, N. Y.). P蛋白質とL蛋白質とを含むウイルスのRNAポリメラーゼに対するプロモーターは、3' 端の一つしか存在しない (Hamaguchi, M. et al., 1983, *Virology* 128:105-117)。各遺伝子の境界部にある短い保存された転写終結配列(Eシグナル) および転写開始配列 (Sシグナル) を認識することによって、このポリメラーゼはリーダーRNAと各mRNAを生成する (Glazier, K. et al., 1997, J. Virol. 21:863-871)。転写終結配列と転写開始配列の間には、転写されない3塩基の介在 (IG) 配列が存在する (Gupta, K. C., and D. W. Kingsbury, 1984, *Nucleic Acids Res.* 12:3829-3841; Luk, D. et al., 1987, *Virology* 160:88-94)。各遺伝子の境界からの転写の再開始効率は高いものの完全ではないため、上流の遺伝子よりも下流の遺伝子の転写量は減少する。従って、感染細胞において各mRNAは等モルでは合成されず、5' 端に行くほど転写量が減少する極性効果が見られる (Glazier, K. et al., 1997, J. Virol. 21:863-871; Homann, H. E. et al., 1990, *Virology* 177:131-140; Lamb, R.A., and D. Kolakofsky, 1996, *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. pp.1177-1204. In *Fields Virology*, 3rd edn. Fields, B. N., D. M. Knipe, and P. M. Howley et al. (ed.), Raven Press, New York, N. Y.)。

mRNAが翻訳され、翻訳産物が蓄積してくると、ゲノムの複製が始まる。このとき、同じウイルスRNAポリメラーゼは、同じRNPを鋳型として複製を行うが、各mRNAの転写終結配列および転写開始配列はなぜか無視され、全長アンチゲノムのポジ

ティブセンス(+)RNPを生成する (Lamb, R.A., and D. Kolakofsky, 1996, *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. pp.1177-1204. In *Fields Virology*, 3rd edn. Fields, B. N., D. M. Knipe, and P. M. Howley et al. (ed.), Raven Press, New York, N. Y.). ポリメラーゼは(+)RNPの3'端にあるプロモーターに入り、ゲノム(-)RNPを生成する。これが次の転写および複製の鋳型として働く。

転写終結配列 (Eシグナル) (ゲノムのネガティブセンスでは、3'-AUUCUUUUUU-5') は、SeVゲノムの6つの遺伝子で完全に保存されている。転写終結配列の後半部の5つのU残基はポリメラーゼのスリップを起こさせ、ポリ(A)を生じさせると考えられている。これに対し、転写開始配列はわずかながら多様性があり、一般的には 3'-UCCCWVUUWC-5' (Gupta, K. C., and D. W. Kingsbury, 1984, *Nucleic Acids Res.* 12:3829-3841)で表される。具体的には、P、M、およびHN遺伝子では、UCCCACUUUC、N遺伝子では UCCCAGUUUC、F遺伝子では UCCCuaUUUC、そして L遺伝子では UCCCACUUaC である。この違いは、これまで配列が決定されているすべてのSeVの株で共通しており、ウイルスの単離経路やパッセージの履歴、およびマウス等の天然の宿主に対する病原性の程度によらない。このことから、この変異は位置特異的であることが示唆される。これらの相異は、転写開始配列中で、変異しても機能に影響を受けない部分に塩基置換が蓄積した結果である可能性もあるが、別の可能性としては、ウイルスの進化の過程で、シグナルの重要な部分に塩基置換が入り、各遺伝子の発現を調節する能力を獲得したものが選択された結果であるとも考えられる。

これまでに、モデル鋳型系を用いたさまざまな非分節型ネガティブ鎖RNAウイルスの研究により、転写開始配列は実際、転写開始には必須であるものの、その配列中の変異はある程度許容されることが示されている (Barr, J. N. et al., 1997, *J. Virol.* 71:1794-1801; Barr, J.N. et al., 1997, *J. Virol.* 71:8718-8725; Hwang, L.N. et al., 1998, *J. Virol.* 72:1805-13; Kuo, L. et al., 1996, *J. Virol.*

70:6143-6150; Rassa, J. C., and G. D. Parks, 1998, *Virology*, 247: 274-286; Stillman E. A., and M. A. Whitt, 1998, *J. Virol.* 72: 5565-5572)。それらの転写開始配列のある種の塩基の変異は、転写の開始効率を低下させることから、天然に起こるバリエーションによってもウイルスのライフサイクルにおいて遺伝子発現が改変されることが示唆されている (Kuo, L. et al., 1996, *J. Virol.* 70:6892-6901; Kuo, L. et al., 1997, *J. Virol.* 71:4944-4953; Stillman E. A., and M. A. Whitt, 1997, *J. Virol.* 71:2127-2137)。しかしながらモデル鋳型系では、トランスに作用する蛋白質が続けて継続的に供給されるため、初期転写のように自然のライフサイクルの初期に必要とされる事象はすべてバイパスされてしまう (Nagai, Y. Paramyxovirus replication and pathogenesis. *Reverse genetics transforms understanding. Rev. Medical. Virol.* 9(2): 83-99 (1999))。また、これらの系では、ミニゲノムの転写と複製はカップルしていない。さらに、トランスに作用する蛋白質を供給するためにしばしば用いられるT7ポリメラーゼ発現ワクシニアウイルスは、例えば、ワクシニアウイルスがコードするキャッピング酵素による転写後修飾などにより、変異による僅かな影響を覆い隠してしまう。それに加えて、トランスフェクションの効率は全実験を通して同一ではないかもしれない (Bukreyev, A. et al., 1996, *J. Virol.* 70:6634-6641; He, B. et al., 1997, *Virology* 237:249-260)。すなわちモデル鋳型系では、転写開始に及ぼす転写開始配列の塩基置換の効果を正確に検証することはできないと考えられる。従って、転写開始配列および転写終結配列の役割を包括的に調べるためには、全長ウイルスゲノムに変異を導入する必要があった。

発明の開示

本発明は、転写開始配列の改変によりその下流の遺伝子群の発現が改変されたパラミクソウイルス科ウイルスベクター、並びにそれらの製造および用途を提供することを課題としている。

本発明者らは既に、組換えDNA技術を用いてゲノムを操作し、感染性のセンダイウイルス (SeV) を作出する系を構築することに成功している。この系を用いれば、DNAをベースにしてネガティブ鎖RNAウイルスを再生させることができ、感染性ウイルスの様々な遺伝子操を通したセンダイウイルスのリバースジェネティクスを行うことが可能となる(Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587; Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71:7266-7272; Kuo, L. et al., 1996, J. Virol. 70:6892-6901; Nagai, Y., 1999, Rev. Medical. Virol. 9: 83-99; Sakaguchi, T. et al., 1997, Virology 235: 360-366)。本発明者らは、この系を用いて、SeVの転写開始配列に見出された異質性の意味を明らかにすることを試みた。

新規に合成した転写終結配列および転写開始配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子上流に連結し、N遺伝子の非コード領域の下流に挿入した。この転写開始配列は天然に生じた上記4つの変異と同じとなるように設計した。構築した組換えウイルスでは、N mRNAの転写は自身の転写開始配列から始まり、レポーター (ルシフェラーゼ) 遺伝子と共に導入された合成転写終結配列で終結する。そして、各々異なる転写開始配列から転写されるレポーター遺伝子の発現を定量し、比較した。

その結果、天然のF遺伝子の転写開始配列は、他の3種の転写開始配列に比べ再開始活性が有意に低いことが判明した。新規の蛋白質合成をブロックし、ゲノム複製を阻害すると転写だけが起こり、複製は起こらない。この条件で実験することにより、ルシフェラーゼ遺伝子発現の減少が、実際、F遺伝子の転写開始配列により転写レベルで減少することが主な要因であり、複製の結果による2次的なものではないことが確かめられた (図4)。またこの実験から、F遺伝子の転写開始配列による再開始活性は、他の3つの転写開始配列による再開始活性に比べ約1/4であることが判明した。

さらに、F遺伝子が天然に持つ転写開始配列を、再開始効率がより高いP/M/HN遺伝子の転写開始配列に置換し、回収したウイルス (SeV/mSf) の培養細胞、卵、およびマウスでの複製能を調べることで、異なる転写開始配列の再開始能を検討

した。その結果、本発明者らは、交換された転写開始配列がF遺伝子のみならず、その下流の遺伝子群の発現をも増強することを見出した。この増強は、やはり転写レベルであった（図7、9）。

即ち、本発明者らは、パラミクソウイルス科ウイルスの各遺伝子の転写開始配列の再開始活性が転写開始配列により異なることを見出すとともに、特定の遺伝子の転写開始配列を再開始活性が異なる他の転写開始配列に置換することで該配列の直下の遺伝子のみならずさらに下流の遺伝子群の発現をも転写レベルで改変しうることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明は、転写開始配列の改変によりその下流の遺伝子群の発現が改変されたパラミクソウイルス科ウイルスベクター、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

- (1) パラミクソウイルス科ウイルスのゲノム上の少なくとも1つの遺伝子の転写開始配列が改変されることにより、宿主内における該遺伝子およびその下流の遺伝子の発現量が改変された、ウイルスベクターDNA、
- (2) 転写開始配列の改変が、パラミクソウイルス科ウイルスの他の遺伝子の転写開始配列への置換である、(1)に記載のウイルスベクターDNA、
- (3) 転写開始配列の改変が、F遺伝子の転写開始配列の、他の遺伝子の転写開始配列への置換である、(1)に記載のウイルスベクターDNA、
- (4) 他の遺伝子の転写開始配列がP/M/HN遺伝子型の転写開始配列である、(3)に記載のウイルスベクターDNA、
- (5) F遺伝子および／またはHN遺伝子が欠損している、(1)から(4)のいずれかに記載のウイルスベクターDNA、
- (6) 外来遺伝子が挿入されている、(1)から(5)のいずれかに記載のウイルスベクターDNA、
- (7) (1)から(6)のいずれかに記載のウイルスベクターDNAからの転写産物をウイルス粒子内部に含む、パラミクソウイルス科ウイルスベクター、

- (8) センダイウイルスベクターである、(7)に記載のベクター、
- (9) 天然型ウイルスと比較して宿主における増殖能力が高まっている、(7)または(8)に記載のベクター、
- (10) (1)から(6)のいずれかに記載のウイルスベクターDNAを宿主に導入し、該宿主内でウイルスタンパク質を発現させる工程を含む、パラミクソウイルス科ウイルスベクターの調製方法、
- (11) パラミクソウイルス科ウイルスがセンダイウイルスである、(10)に記載の方法、を提供する。

なお、本発明において「パラミクソウイルス科ウイルスベクター」とは、パラミクソウイルス科ウイルスに由来し、遺伝子を宿主細胞に導入することができるベクター（担体）を指す。本発明のパラミクソウイルス科ウイルスベクターはリボ核タンパク質（RNP）であってもよく、また、感染力を有するウイルス粒子であってもよい。「感染力」とは、ウイルスベクターが細胞への接着能および膜融合能を保持していることにより、細胞内にウイルス粒子内部のウイルスゲノムを導入し発現させることのできる能力を指す。

本発明のパラミクソウイルス科ウイルスベクターは、複製能を有していてもよく、複製能を有さない欠損型ベクターであってもよい。「複製能を有する」とは、ウイルスベクターが宿主細胞に感染した場合、該細胞においてウイルスが複製され、感染性ウイルス粒子が産生されることを指す。

また、本発明のパラミクソウイルス科ウイルスベクターは、外来遺伝子を発現することができるように保持することができる。このようなウイルスベクターは組み換えパラミクソウイルス科ウイルスベクターとして作製することができる。

「組み換え」パラミクソウイルス科ウイルスベクターとは、遺伝子操作により構築されたパラミクソウイルス科ウイルスベクターまたはそれを増幅して得られるパラミクソウイルス科ウイルスベクターを言う。組換えパラミクソウイルス科ウイルスベクターは、例えば、組換えパラミクソウイルス科ウイルスcDNAを再構成

して生成することができる。

本発明においてパラミクソウイルス科ウイルスとはパラミクソウイルス科に属するウイルスまたはその誘導体を指す。本発明を適用可能なパラミクソウイルス科ウイルスとしては、例えばパラミクソウイルス科(*Paramyxoviridae*)のセンダイウイルス(Sendai virus)、ニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス(Mumps virus)、麻疹ウイルス(Measles virus)、RSウイルス(Respiratory syncytial virus)、牛痘ウイルス(rinderpest virus)、ジステンパーウイルス(distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス(SV5)、ヒトパラインフルエンザウイルス1,2,3型等が挙げられる。本発明のウイルスベクターおよびベクターDNAが由来するウイルスは、好ましくはパラミクソウイルス属(*Paramyxovirus*)に属するウイルスまたはその誘導体である。本発明を適用可能なパラミクソウイルス属ウイルスとしては、例えばセンダイウイルス(Sendai virus)およびヒトHA2などを含むパラインフルエンザウイルス1型、サルSV5およびSV41並びにヒトCAなどを含むパラインフルエンザウイルス2型、ウシSFおよびヒトHA1などを含むパラインフルエンザ3型、パラインフルエンザ4型(A亜型およびB亜型を含む)、ムンプスウイルス、ニューカッスルウイルス、並びにその他の多くのパラミクソウイルス属ウイルスが含まれる。本発明のウイルスベクターおよびベクターDNAが由来するパラミクソウイルス科ウイルスは、最も好ましくはセンダイウイルスである。これらのウイルスは、天然株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などであり得る。DI粒子(J. Virol. 68, 8413-8417(1994))等の不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も、本発明のウイルスベクターを製造するための材料として使用することができる。

本発明において「ウイルスベクターDNA」とは、ウイルスベクターのゲノムをコードする塩基配列を含むDNAを指す。また、本発明において「DNA」とは、一本鎖DNAおよび二本鎖DNAを含む。

また、パラミクソウイルス科ウイルスの「N、P、M、F、HN、およびL遺伝子」と

は、それぞれヌクレオキャプシド、ホスホ、マトリックス、フュージョン、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ、およびラージ蛋白質をコードする遺伝子のことを指す。例えばパラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に次のように表記される。一般に、N遺伝子は「NP遺伝子」と表記されることもある。

レスピロウイルス属	N	P/C/V	M	F	HN	-	L
ルブラウイルス属	N	P/V	M	F	HN (SH)		L
モービリウイルス属	N	P/C/V	M	F	H	-	L

例えばセンダイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、N遺伝子については M29343、M30202、M30203、M30204、M51331、M55565、M69046、X17218、P遺伝子については M30202、M30203、M30204、M55565、M69046、X00583、X17007、X17008、M遺伝子については D11446、K02742、M30202、M30203、M30204、M69046、U31956、X00584、X53056、F遺伝子については D00152、D11446、D17334、D17335、M30202、M30203、M30204、M69046、X00152、X02131、HN遺伝子については D26475、M12397、M30202、M30203、M30204、M69046、X00586、X02808、X56131、L遺伝子については D00053、M30202、M30203、M30204、M69040、X00587、X58886を参照のこと。

本発明は、パラミクソウイルス科ウイルスのゲノム上の少なくとも1つの遺伝子の転写開始配列が改変されることにより、宿主内における該遺伝子およびその下流の遺伝子の発現量が改変された、ウイルスベクターDNAを提供する。本発明のウイルスベクターDNAは、転写開始配列の改変により、その直下の遺伝子のみならず、さらに下流の遺伝子の転写をも改変し得ることを特徴とする。

本発明における「転写開始配列の改変」とは、パラミクソウイルス科ウイルスのゲノム上の遺伝子の転写開始配列において1若しくは数個の塩基を置換、欠失、付加および/または挿入すること、或いは他の遺伝子の転写開始配列への置換を行なうことを指す。

転写開始配列を改変して、所望の再開始活性を有する配列を得るためには、種々の転写開始配列をデザインし、実施例 1 に記載のルシフェラーゼ解析などを利用して、それら再開始活性を検出し、所望の活性を有する配列を選択すれば良い。転写開始配列の改変は、公知の遺伝子組換え技術を用いて行うことができる。例えば、実施例 3 に記載のように部位特異的変異挿入法により、パラミクソウイルス科ウイルスゲノムの F 遺伝子の転写開始配列に任意の変異を導入することができる。

本発明のパラミクソウイルス科ウイルスベクターは、転写開始配列の改変により、例えば F 遺伝子の発現量が、野生型に比べ有意に上昇しているウイルスベクターが含まれる。有意な上昇とは、例えば野生型の F 遺伝子の発現に比べ 20% 以上、好ましくは 40% 倍以上、より好ましくは 2 倍以上、さらに好ましくは 3 倍以上の上昇である。このようなベクターは、例えば F 遺伝子の転写開始配列を、P、M、HN、N、または L 遺伝子の転写開始配列に置換することにより製造することができる。また本発明のパラミクソウイルス科ウイルスベクターには、P、M、HN、N、および L 遺伝子のいずれか、またはその組み合わせが、野生型の発現に比べ有意に低下しているウイルスベクターが含まれる。有意な低下とは、例えば野生型の発現に比べ 20% 以上、より好ましくは 30% 以上、さらに好ましくは 40% 以上、さらに好ましくは 60% 以上低下しているベクターが含まれる。このようなベクターは、例えば P、M、HN、N、および/または L 遺伝子の転写開始配列を、F 遺伝子の転写開始配列に置換することにより製造することができる。遺伝子の発現量の測定は、例えば mRNA (転写産物) または蛋白質 (翻訳産物) の検出を通して測定され得る。発現量の測定は、好ましくはウイルスの複製速度の影響を最小限に留める条件下で行われる。例えば、実施例図 3 で実施されたような、複製サイクルが一回まわる条件下で測定したり、または図 4 に示したように、RNA または蛋白質の検出により初期転写を特異的に測定することにより遺伝子の発現を測定することができる。これらの測定は、例えば実施例 1 または 2 に記載の方法等により行

うことができる。

本発明者等は、パラミクソウイルス科ウイルス（センダイウイルス）に見られる4種類の転写開始配列の再開始活性を検出したところ、それぞれ活性が異なり、L遺伝子の転写開始配列（AGGGTGAAT）、P/M/HN遺伝子の転写開始配列（AGGGTGAAA）、およびN遺伝子の転写開始配列（AGGGTCAAA）の転写開始活性が高い値を示したのに対し、F遺伝子の転写開始配列（AGGGATAAA）の転写開始活性が低い値を示すことを見出した。従って、高い再開始活性を望む場合には、L遺伝子、P/M/HN遺伝子、あるいはN遺伝子の転写開始配列を用いればよく、低い再開始活性を望む場合には、F遺伝子の転写開始配列を用いればよい。例えば、F遺伝子の転写開始配列を、再開始活性の高いP/M/HN遺伝子の転写開始配列に置換することにより、F遺伝子およびその下流の遺伝子群の転写レベルを上昇させることができる。

パラミクソウイルス科ウイルス遺伝子の転写レベルを改変することには、様々な利点が存在する。例えば、F遺伝子の転写開始配列を再開始活性のより高い転写開始配列に置換したウイルスは、増殖力の上昇が期待できる。また、例えば F遺伝子の転写開始配列と L遺伝子の転写開始配列を交換すれば、ウイルスの増殖力はそのままにして、F遺伝子および HN遺伝子の発現量だけを上げることが期待できる。また、あまり高い発現が好ましくない蛋白質の場合には、F遺伝子の転写開始配列のような再開始活性の低い転写開始配列の下流に連結することで発現量を制限することも可能である。

転写開始配列が、転写の再開始活性の高いものに改変された遺伝子を持つウイルスゲノムでは、従来の野生型ゲノムと比較して、その下流にコードされている mRNA の発現量が増える。下流に所望の外来遺伝子が存在する場合、得られる生産物量も増えると予想される。従って、このようなゲノムを持つウイルスベクターは、産物の生産効率が向上するという利点を有する。また、医薬品組成物やワクチンとして、組換えウイルス粒子またはウイルス様粒子を回収する場合、このようなゲノムを持つウイルスでは、短期間で多量のウイルスを回収することが可能

であるという利点を有している。例えば、37°Cで2日間インキュベートされたウイルス粒子は、ウイルス粒子間で複合体を作り、元の形から変形する aging (老化) 現象を起こすことが知られている (Kim, J. et al. Virology 95: 523-35 (1979))。彼らの電顕観察によると、若い粒子はヌクレオカプシドの構造がタイトに折りたたまれているが、aging に伴いルーズな構造に変化する。ウイルス粒子またはウイルス様粒子を医薬品組成物やワクチンとして利用する場合には、均一な材料を得ることが重要である。従って、なるべく短期間の培養でウイルスを回収することが必要である。実施例に示されるように、本発明により、改変ウイルスを野生型に比べ 100倍の力価で調製することも可能となる (図5)。

本発明のパラミクソウイルス科ウイルスベクターとしては、例えば、複製能を有し、自立的に増殖するようなベクターが挙げられる。例えば、一般に天然型パラミクソウイルスのゲノムは、3' の短いリーダー領域に続き、N (ヌクレオキャプシド)、P (ホスホ)、M (マトリックス)、F (フュージョン)、HN (ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ)、およびL (ラージ) 蛋白質をコードする6つの遺伝子が並んでおり、短い5' トレイラー領域を他端に有する。これと同様の構造を有するゲノムを設計することにより、自律複製可能なベクターを製造することができる。なお、本発明のパラミクソウイルス科ウイルスベクターにおいては、ウイルス遺伝子の配置は野生型ウイルスから改変されていてもよい。

また、本発明のパラミクソウイルス科ウイルスベクターとしては、野生型パラミクソウイルス科ウイルスが持つ遺伝子のいずれかを欠損したものであってもよい。例えば、センダイウイルス科ウイルスベクターを再構成させる場合、N、P/C およびL遺伝子から作られる蛋白質群がトランスに必要だと考えられているが、該蛋白質群をコードする遺伝子自体は、本発明のウイルスベクターに必ずしも含まれている必要はない。例えば、該蛋白質群をコードする遺伝子を有する発現ベクターを、ベクターゲノムをコードする発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、再構成を行うことができる。また、該蛋白質群をコ

ードする遺伝子を有する宿主細胞にベクターゲノムをコードする発現ベクターを導入し、該宿主細胞から該蛋白質群を供給して再構成を行ってもよい。これらの蛋白質群のアミノ酸配列は、ウイルス由来の配列そのままでもなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、パラミクソウイルス科ウイルスが細胞に伝播してゆくためには、M、FおよびHN遺伝子から作られる蛋白質群が必要だと考えられているが、パラミクソウイルス科ウイルスベクターをRNPとして調製する場合は、これらの蛋白質は必要ない。RNPに含まれるゲノムに、M、FおよびHN遺伝子が含まれていれば、宿主に導入された時に、これらの遺伝子産物が生産され、感染性のあるウイルス粒子が形成される。

RNPを細胞に導入するには、例えばリポフェクトアミンやポリカチオニックリポソームなどと共に複合体を形成させて導入することが可能である。具体的には、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169) などが挙げられる。エンドソーム中での分解を防ぐため、クロロキンを加えることもできる (Calos, M.P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。複製型ウイルスの場合、産生されたウイルスは、培養細胞、鶏卵、個体（例えばマウスなどの哺乳動物）などに再感染させて増幅または継代することができる。

逆に、M、Fおよび/またはHN遺伝子が含まれていないパラミクソウイルス科ウイルスベクターも、本発明のウイルスベクターとして用いることができる。このようなウイルスベクターの再構成は、例えば、欠損している遺伝子産物を外来的に供給することにより行うことができる。このようにして製造されたウイルスベクターは、野生型ウイルスと同様に宿主細胞に接着して細胞融合を起こすが、細胞に導入されたベクターゲノムはこれらのいずれかの遺伝子を欠損しているため、最初と同じような感染力を持つ娘ウイルス粒子は形成されない。このため、一回

限りの遺伝子導入力を持つ安全なウイルスベクターとして有用である。ゲノムから欠損させる遺伝子としては、例えばF遺伝子および／またはHN遺伝子が挙げられる。例えば、F遺伝子が欠損した組換えパラミクソウイルス科ウイルスベクターゲノムを発現するプラスミド（ウイルスベクターDNAを含んでいる）を、F蛋白質の発現ベクターならびにN、P/CおよびL蛋白質の発現ベクターと共に宿主細胞にトランスフェクションすることにより、F遺伝子を欠損したウイルスベクターの再構成を行うことができる（国際出願番号 PCT/JP00/03194 および PCT/JP00/03195）。また、例えば、F遺伝子が染色体に組込まれた宿主細胞を用いて製造することもできる。これらの蛋白質群を外から供給する場合、そのアミノ酸配列はウイルス由来の配列そのままでもなくとも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

また、ベクターゲノムが由来するウイルスのエンベロープ蛋白質とは異なる蛋白質をベクターのエンベロープに含むベクターを作製することもできる。このようなタンパク質に特に制限はない。例えば、他のウイルスのエンベロープタンパク質、例えば水疱性口内炎ウイルス（VSV）のGタンパク質（VSV-G）を挙げることができる。本発明のウイルスベクターは、VSV-Gタンパク質などのように、ゲノムが由来するウイルス以外のウイルスに由来するエンベロープタンパク質を含むシールドタイプウイルスベクターが含まれる。

本発明のウイルスベクターDNAには、所望の外来遺伝子を導入することができる。外来遺伝子は蛋白質をコードしてもよく、また蛋白質をコードしていなくてもよい。例えば、外来遺伝子はリボザイムまたはアンチセンスRNAなどの機能的RNAをコードするものであってもよい。外来遺伝子は天然由来または人為的に設計された配列であり得る。例えば、遺伝子治療などを目的とする場合には、該ウイルスベクターDNAに対象となる疾患の治療用遺伝子を挿入する。本発明のウイルスベクターDNAを遺伝子治療ベクターの製造目的に用いる場合には、宿主内での毒性を

抑制するために、F遺伝子、HN遺伝子、および/またはM遺伝子を欠失させておくことが好ましい。ウイルスベクターDNAに外来遺伝子を導入する場合は、例えば、センダイウイルスベクターDNAにおいては、転写終結配列と転写開始配列との間などに、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい（Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 1993, p. 4822-4830）。外来遺伝子は、ウイルスの各遺伝子（N、P、M、F、HN、またはL遺伝子）の前および/または後ろに挿入することができる。前後の遺伝子の発現を妨げないようにするため、外来遺伝子の前または後ろに適宜 E-I-S配列（転写開始配列－介在配列－転写終結配列）またはその部分を挿入する。挿入した外来性遺伝子の発現量は、外来遺伝子の5'側（先頭）に付加する転写開始配列の種類により調節することができる。また、遺伝子挿入の位置、また遺伝子の前後の塩基配列により調節しうる。例えば、センダイウイルスにおいては、挿入位置がN遺伝子に近いほど、挿入された遺伝子の発現量が多いことが知られている。

一般に、挿入位置はウイルスゲノムのネガティブ鎖RNAの3'端に近いほど（野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、N遺伝子に近いほど）、挿入された遺伝子の発現量が高い。外来遺伝子の高い発現を得るためには、外来遺伝子をN遺伝子の上流（マイナス鎖においては3'側）またはN遺伝子とP遺伝子の間など、ネガティブ鎖ゲノムにおいて3'端に近い領域に挿入することが好ましい。逆に、挿入位置がネガティブ鎖RNAの5'端に近いほど（野生型ウイルスのゲノム上の遺伝子配置においては、L遺伝子に近いほど）、挿入された遺伝子の発現量が低くなる。外来遺伝子の発現を低く抑えるためには、例えばネガティブ鎖の最も5'側、すなわち野生型ウイルスゲノムにおいてはL遺伝子の下流（ネガティブ鎖においてはL遺伝子の5'隣接部位）、またはL遺伝子の上流（ネガティブ鎖においてはL遺伝子の3'隣接部位）に外来遺伝子を挿入する。このように、外来遺伝子の挿入位置は、該遺伝子の所望の発現量を得るために、また前後のウイルスタンパク質をコードする遺伝子との組み合わせが最適となる様に適宜調節することができる。外来遺

伝子を容易に挿入できるようにするために、挿入部位にクローニングサイトを設計することができる。クローニングサイトは、例えば制限酵素の認識配列とすることができる。ゲノムをコードするベクターDNA中の当該制限酵素部位に外来遺伝子断片を挿入することができる。クローニングサイトは、複数の制限酵素認識配列を有する、いわゆるマルチクローニングサイトとしてもよい。また、本発明のベクターDNAは、このように挿入した以外に位置に他の外来遺伝子を保持していてもよい。

外来遺伝子を有する組換えセンダイウイルスベクターは、例えば、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587及びYu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466の記載に準じて、次のようにして構築することができる。

まず、所望の外来遺伝子のcDNA塩基配列を含むDNA試料を用意する。DNA試料は、25ng/ μ l以上の濃度で電気泳動的に単一のプラスミドと確認できることが好ましい。以下、外来遺伝子をNotI部位を利用してウイルスゲノムをコードするDNAに挿入する場合を例にとって説明する。目的とするcDNA塩基配列の中にNotI認識部位が含まれる場合は、部位特異的変異挿入法などを用いて、コードするアミノ酸配列を変化させないように塩基配列を改変し、NotI部位を予め除去しておくことが好ましい。この試料から所望の遺伝子断片をPCRにより増幅回収する。増幅された断片の両端がNotI部位とし、さらに一端にセンダイウイルスの転写終結配列 (E)、介在配列 (I) 及び転写開始配列 (S) (EIS配列) のコピーを付加するために、NotI制限酵素切断部位配列及び転写終結配列 (E)、介在配列 (I) 及び転写開始配列 (S) と目的遺伝子の一部の配列を含むプライマー対として、フォワード側合成DNA配列及びリバーズ側合成DNA配列(アンチセンス鎖)を作成する。

例えば、フォワード側合成DNA配列は、NotIによる切断を保証するために 5' 側に任意の2以上のヌクレオチド (好ましくはGCG、およびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT) を選択し、その3' 側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3' 側にスペーサー配列として任意の9塩

基または9に6の倍数を加えた数の塩基を付加し、さらにその3'側に所望のcDNAの開始コドンATGからこれを含めてORFの約25塩基相当の配列を付加した形態とする。最後の塩基はGまたはCとなるように該所望のcDNAから約25塩基を選択してフォワード側合成オリゴDNAの3'の末端とすることが好ましい。

リバーズ側合成DNA配列は5'側から任意の2以上のヌクレオチド（好ましくはGCG、およびGCCなどのNotI認識部位由来の配列が含まれない4塩基、更に好ましくはACTT）を選択し、その3'側にNotI認識部位gcggccgcを付加し、さらにその3'側に長さを調節するための挿入断片のオリゴDNAを付加する。このオリゴDNAの長さは、NotI認識部位gcggccgcを含め、cDNAの相補鎖塩基配列と後述するセンダイウイルスに由来するセンダイウイルスゲノムのE I S塩基配列の合計が6の倍数になるように塩基数を設計する（いわゆる「6のルール(rule of six)」; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72:891-899, 1998)。さらに挿入断片の3'側にセンダイウイルスのS配列の相補鎖配列、好ましくは5'-CTTTCACCCT-3'、I配列、好ましくは5'-AAG-3'、E配列の相補鎖配列、好ましくは5'-TTTTTCTTACTACGG-3'、さらにその3'側に所望のcDNA配列の終始コドンから逆に数えて約25塩基相当の相補鎖の最後の塩基がGまたはCになるように長さを選択して配列を付加し、リバーズ側合成オリゴDNAの3'の末端とする。

PCRは、例えば、ExTaqポリメラーゼ（宝酒造）を用いる通常の方法を用いることができる。好ましくはVentポリメラーゼ（NEB）を用いて行い、増幅した目的断片はNotIで消化した後、プラスミドベクターpBluescriptのNotI部位に挿入する。得られたPCR産物の塩基配列をシーケンサーで確認し、正しい配列のプラスミドを選択する。このプラスミドから挿入断片をNotIで切り出し、ゲノムcDNAを含むプラスミドのNotI部位にクローニングする。またプラスミドベクターpBluescriptを介さずにNotI部位に直接挿入し、組換えセンダイウイルスcDNAを得ることも可能である。

本発明のウイルスベクターDNAは、これを宿主細胞へ導入し発現させることによ

り、該ウイルスベクターDNAからの転写産物をウイルス粒子内部に含むウイルスベクターを調製することができる。具体的には、例えば本発明のウイルスベクターDNAを宿主に導入し、該宿主内でウイルスタンパク質を発現させればよい。ウイルスベクターDNAの宿主への導入および該宿主内でのウイルスタンパク質の発現は、どちらを先に行ってもよく、また同時に行ってもよい。ウイルスタンパク質は、例えばウイルスタンパク質をコードする発現ベクターの導入により宿主内で発現させることができる。ウイルスベクターDNAにおいて、F遺伝子、HN遺伝子、および/またはM遺伝子を欠失させた場合には、そのままでは感染性のウイルス粒子を形成しないが、宿主細胞に、これら欠失させた遺伝子および/または他のウイルスのエンベロープ蛋白質をコードする遺伝子などを別途、導入し発現させることにより、感染性ウイルス粒子を形成させることが可能である。

例えば、ウイルスベクターDNAを細胞内に導入する方法には、次のような方法、①目的の細胞が取り込めるようなDNA沈殿物を作る方法、②目的の細胞による取りこみに適し、かつ細胞毒性の少ない陽電荷特性を持つDNAを含む複合体を作る方法、③目的の細胞膜に、DNA分子が通り抜けられるだけに十分な穴を電気パルスによって瞬間的に開ける方法などがある。

②としては、種々のトランスフェクション試薬が利用できる。例えば、DOTMA (Boehringer)、Superfect (QIAGEN #301305)、DOTAP、DOPE、DOSPER (Boehringer #1811169) などが挙げられる。①としては例えばリン酸カルシウムを用いたトランスフェクション法が挙げられ、この方法によって細胞内に入ったDNAは貪食小胞に取り込まれるが、核内にも十分な量のDNAが入ることが知られている (Graham, F.L. and Van Der Eb, J., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223)。ChenおよびOkayamaはトランスファー技術の最適化を検討し、1) 細胞を共沈殿物のインキュベーション条件を 2~4% CO₂、35°C、15~24時間、2) DNAは直鎖状より環状のものが活性が高く、3) 沈殿混液中のDNA濃度が 20~30 μ g/mlのとき最適な沈殿が得られると報告している (Chen, C. and

Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745)。②の方法は、一過的なトランスフェクションに適している。古くはDEAE-デキストラン (Sigma #D-9885 M.W. 5×10^5) 混液を所望のDNA濃度比で調製し、トランスフェクションを行う方法が知られている。複合体の多くはエンドソームの中で分解されてしまうため、効果を高めるためにクロロキンを加えることもできる (Calos, M.P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015)。③の方法は電気穿孔法と呼ばれる方法で、細胞選択性がないという点で①や②の方法に比べて汎用性が高い。効率はパルス電流の持続時間、パルスの形、電界 (電極間のギャップ、電圧) の強さ、バッファの導電率、DNA濃度、細胞密度の最適条件下で良いとされている。

以上、3つのカテゴリーの中で②の方法は操作が簡便で多量の細胞を用いて多数の検体を検討することができるので、本発明においては、トランスフェクション試薬が適している。好適には Superfect Transfection Reagent (QIAGEN, Cat No. 301305)、または DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Boehringer Mannheim, Cat No. 1811169) が用いられる。

cDNAからのウイルスの再構成は、公知の方法を用いて行うことができる (国際公開97/16539号; 国際公開97/16538号; Durbin, A.P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S.P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell, M.J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M.D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R.M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404)。これらの方法により、パラインフルエンザ、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、麻疹ウイルス、リンダーベストウイルス、センドライウイルスなどを含むパラミクソウイルス科ウイルスベクターをベクターDNAから再構成させることができる。

一例を示すと、24穴から6穴程度のプラスチックプレートまたは100mmペトリ皿上で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質(100 units/ml ペニシリンGおよび100 μ g/ml ストレプトマイシン)を含む最少必須培地(MEM)を用いてサル腎臓由来細胞株LLCMK2を70~80%コンフルエントになるまで培養し、例えば1 μ g/ml psoralen(ソラレン)存在下UV照射処理を20分処理で不活化した、T7ポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルスvTF7-3(Fuerst, T.R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986、Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)を2 PFU/細胞で感染させる。ソラレンの添加量およびUV照射時間は適宜調整することができる。感染1時間後、2~60 μ g、より好ましくは3~5 μ gの上記の組換えセンダイウイルスcDNAを、全長センダイウイルスゲノムの生成に必要なトランスに作用するウイルスタンパク質を発現するプラスミド(24-0.5 μ gのpGEM-N、12-0.25 μ gのpGEM-P、および24-0.5 μ gのpGEM-L、より好ましくは例えば1 μ gのpGEM-N、0.5 μ gのpGEM-P、および1 μ gのpGEM-L)(Kato, A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996)と共にSuperfect(QIAGEN社)を用いたリポフェクション法等によりトランスフェクションする。トランスフェクションを行った細胞は、所望により100 μ g/mlのリファンピシン(Sigma)及びシトシンアラビノシド(AraC)、より好ましくは40 μ g/mlのシトシンアラビノシド(AraC)(Sigma)のみを含む血清不含のMEMで培養し、ワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするように薬剤の最適濃度を設定する(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)。トランスフェクションから48~72時間程度培養後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、LLCMK2細胞にトランスフェクションして培養する。培養3~7日後に培養液を回収する。エンベロープ蛋白質をコードする遺伝子を欠損した複製能を持たないウイルスベクターを再構成させるには、エンベロープタンパク質を発現するLLCMK2細胞をトランスフェクションに使用するか、またはエンベロープ発現プラスミドを共にトランスフェクションすればよい。また、トランスフェクションを行った細胞にエ

ンベロープタンパク質を発現するLLCMK2細胞に重層して培養することによって欠損型ウイルスベクターを増幅することもできる（国際出願番号 PCT/JP00/03194 および PCT/JP00/03195参照）。培養上清に含まれるウイルス力価は赤血球凝集活性(HA)を測定することにより決定することができる。HAは「endo-point 希釈法」（Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579）により決定することができる。得られたウイルスストックは-80℃で保存することができる。

ウイルスベクターが再構成する限り、再構成に用いる宿主細胞は特に制限されない。例えば、センダイウイルスベクター等の再構成においては、サル腎由来のCVI細胞やLLCMK2細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞、ヒト由来細胞などの培養細胞を使うことができる。また、大量にセンダイウイルスベクターを得るために、上記の宿主から得られたウイルスベクターを発育鶏卵に感染させ、該ベクターを増幅することができる。鶏卵を使ったベクターの製造方法は既に開発されている（中西ら編（1993）「神経科学研究の先端技術プロトコールIII, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp.153-172）。具体的には、例えば、受精卵を培養器にいれ9～12日間 37～38℃で培養し、胚を成長させる。ウイルスベクターを漿尿膜腔へ接種し、数日間卵を培養してウイルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、使用する組換えウイルスにより変わり得る。その後、ウイルスを含んだ漿尿液を回収する。また、漿尿液からのセンダイウイルスの分離・精製は常法に従って行うことができる（田代真人, 「ウイルス実験プロトコール」, 永井、石浜監修, メジカルビュー社, pp.68-73, (1995)）。

本発明のウイルスベクターには、そのエンベロープ表面が特定の細胞に接着しうるように、接着因子、リガンド、受容体等、またはそれらの断片が含まれていても構わない。例えば、これらの蛋白質を細胞外領域に有し、ウイルスエンベロープ由来のポリペプチドを細胞内領域に有するキメラタンパク質などを含むベクターを作製すれば、特定の組織を標的とするベクターを作り出すこともできる。これらはウイルスゲノムにコードされていてもよいし、ウイルスベクターの再構

成時に、ゲノム以外の遺伝子（例えば別の発現ベクターまたは宿主染色体などの遺伝子）の発現により供給されてもよい。

また、組換え体ウイルスベクターは、例えば、免疫原性を低下させるために、また、RNAの転写効率や複製効率を高めるために、その内部に含まれるウイルス遺伝子が改変されたものであってもよい。具体的には、例えば複製因子であるN遺伝子、P/C遺伝子およびL遺伝子の少なくとも一つを改変し、転写または複製の機能を高めることが考えられる。また、構造体蛋白質の1つであるHN蛋白質は、赤血球凝集素であるヘマグルチニン（hemagglutinin）活性とノイラミニダーゼ（neuraminidase）活性との両者の活性を有するが、例えば前者の活性を弱めることができれば、血液中でのウイルスの安定性を向上させることが可能であろうし、例えば後者の活性を改変することにより、感染能を調節することも可能である。また、膜融合に関わるF蛋白質を改変することにより、膜融合リボソームの融合能を調節することもできる。また、例えば、細胞表面の抗原分子となりうるF蛋白質やHN蛋白質の抗原提示エピトープ等を解析し、これを利用して抗原提示能を弱めたパラミクソウイルス科ウイルスベクターを作製することもできる。

欠損型ウイルスベクターを調製する場合、例えば、ゲノム上で欠損しているエンベロープ遺伝子が異なる2種のベクターを同じ細胞に導入すれば、それぞれで欠損するエンベロープタンパク質が、もう一方の複合体からの発現により供給されるため、互いに相補しあって感染力のあるウイルス粒子が形成され、複製サイクルがまわりウイルスベクターが増幅される。すなわち、2種またはそれ以上の本発明のベクターを、エンベロープタンパク質を相補する組み合わせで接種すれば、それぞれのエンベロープ遺伝子欠損型ウイルスベクターの混合物を大量かつ低コストで生産することができる。これらのウイルスは、エンベロープ遺伝子が欠損しているため、エンベロープ遺伝子を欠損していないウイルスに比べゲノムサイズが小さくなり長い外来遺伝子を保持することができる。また、元々感染性のないこれらのウイルスは細胞外で希釈され共感染の維持が困難であることか

ら、不稔化するため、環境放出管理上の利点がある。

このようにして得られたウイルスベクターの遺伝子治療への応用としては、直接投与による遺伝子発現、間接 (ex vivo) 投与による遺伝子発現のいずれの方法によっても、治療効果を期待できる外来遺伝子もしくは患者の体内で供給が不足している内在遺伝子を発現させることが可能である。外来遺伝子としては特に制限はなく、蛋白質をコードする核酸に加え、例えば、アンチセンスまたはリボザイムなどのタンパク質をコードしない核酸であってもよい。蛋白質をコードする外来遺伝子としては、特に制限はないが、天然の蛋白質としては、例えばホルモン、サイトカイン、増殖因子、受容体、酵素、ペプチドなどが挙げられる。蛋白質は分泌蛋白質、膜蛋白質、細胞質蛋白質、核蛋白質などであり得る。人工的な蛋白質としては、例えば、キメラ毒素などの融合蛋白質、ドミナントネガティブ蛋白質 (受容体の可溶性分子または膜結合型ドミナントネガティブ受容体を含む)、欠失型の細胞接着分子および細胞表面分子などが挙げられる。また、分泌シグナルや膜局在化シグナル、核移行シグナル等を付加した蛋白質であってもよい。また、アンチセンスRNA分子またはRNA切断型リボザイムなどを発現させて腎細胞で発現する望ましくない遺伝子の機能を抑制することもできる。投与可能な本発明のベクターが応用できる遺伝子治療の対象としては、細胞を死滅させる、例えば自殺遺伝子と呼ばれる、感染細胞に毒性を示す遺伝子 (HSV tk 等) を発現させることによる癌治療、動脈硬化による冠動脈再狭窄予防治療などが考えられる。また、細胞の生存を持続させる方向としては、単一遺伝子病等で、欠失または欠損の知られている遺伝子、例えばADA、CFTRなどの遺伝子産物を補充するという応用が考えられる。

いずれの方向においても、本発明のベクターはRNAをゲノムとし、その転写および自己複製プロセス中にDNAに変換されることがなく、生殖細胞等の染色体に取り込まれて次世代の遺伝子に影響を及ぼす心配がないため、広範囲の疾患に応用することができる。すなわち、多数の遺伝子が原因となる病気、高血圧、糖尿病、

ぜん息、虚血性心疾患等の疾患にも応用でき、また、ワクチン等の多数の健康な人々を対象とした治療法や予防法、種々の感染症、エイズ、マラリア、インフルエンザ等のワクチン予防にも応用できる。

本発明のウイルスベクターは、薬学的に許容される所望の媒体と共に組成物とすることができる。「薬学的に許容される担体」とは、ベクターと共に投与することが可能であり、ベクターによる遺伝子導入を阻害しない材料である。例えば本発明のウイルスベクターを生理食塩水やリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) などで適宜希釈して組成物とすることができる。本発明のウイルスベクターを鶏卵で増殖させた場合等においては漿尿液を含んでよい。また本発明のウイルスベクターを含む組成物は、脱イオン水、5%デキストロース水溶液等の媒体を含んでいてもよい。さらに、その他にも、安定剤、殺生物剤等が含有されていてもよい。本発明のウイルスベクター含有組成物の投与対象としては、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシ、イヌなど全ての哺乳動物が含まれる。

図面の簡単な説明

図1は、pSeV18c(+)の構築とN ORFの下流域へのルシフェラーゼ遺伝子の挿入の概要を示す図である。NotI部位を含むように設計した18塩基の断片を、部位特異的変異により、pSeV(+)中のSeVゲノムの3'末端から1698位～1699位の間に挿入した (Shioda, T. et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:7317-7330)。この結果得られた、18塩基からなる断片を付加したSeVアンチゲノムをコードするプラスミドをpSeV18c(+)と名付けた。ルシフェラーゼ遺伝子のORFは、pHvLuc-RT4プラスミド (Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579) を鋳型として、NotIタグを付けた4組のプライマー (ESn/NotLr, ESp/NotLr, ESf/NotLr, およびESl/NotLr) を用いてPCRにより増幅した。このようにして、ルシフェラーゼ遺伝子の先頭に各々異なる天然の転写開始配列を付加した断片を生成した。これらの増幅断片はNotIで切断し、pSeV18c(+)のNotI部位に挿入した。作製されたプラスミド

pSeV(+)SnLuc、pSeV(+)SpLuc、pSeV(+)SfLuc、およびpSeV(+)SlLucを用いて、それぞれの組換え体 SeV/SnLuc、SeV/SpLuc、SeV/SfLuc、およびSeV/SlLucを再構築させた。

図 2 は、SeVの遺伝子構築を示す図である。

図 3 は、SeV/SpLuc、SeV/SnLuc、SeV/SfLuc、およびSeV/SlLucからのルシフェラーゼの発現を示す図である。組換えウイルスをmoi 10 (pfu/cell) でCV1細胞に接種し、図示された時間(hr)に、ルシフェラーゼ活性を測定した。

図 4 は、組換えSeVからのルシフェラーゼの発現を示す写真および図である。組換えウイルスをmoi 100 (pfu/cell) でCV1細胞に接種し、シクロヘキシミド存在下で12時間培養した。細胞の一部を回収し、RNAを調製後、ルシフェラーゼプローブで解析した(上段)。残りの細胞は、さらにシクロヘキシミド非存在下で 0、2、および4時間培養してタンパク質を合成させ、ルシフェラーゼ活性を測定した(下段)。

図 5 は、SeV/mSfの増殖速度(kinetics)を示す図である。一段増殖サイクル条件下において、野生型SeVおよび変異型SeV/mSfの力価を図示された時間に測定した。白と黒の棒は、それぞれ野生型およびSeV/mSfのHAUを表す。白および黒の丸を結ぶ線は、それぞれ野生型およびSeV/mSfのpfu/mlを表す。

図 6 は、SeV/mSfの細胞毒性を示す写真である。トリプシン存在下(+)または非存在下(-)で、野生型またはSeV/mSfをmoi 20 (pfu/cell) でCV1細胞に感染させた。感染48時間後に写真を撮影した。

図 7 は、ウイルス遺伝子の細胞内発現を示す写真である。野生型SeVまたはSeV/mSfを感染させたCV1細胞を、感染後さまざまな時間(hr)に、ウイルスのN、P、F、またはL遺伝子をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションにより解析した。mRNAの位置とゲノム/アンチゲノム RNA (vRNA) の位置を図中に示した。

図 8 は、ウイルス遺伝子の細胞内発現を示す写真である。各レーンの上を示した時間(hr)におけるCV1細胞でのウイルス遺伝子の細胞内発現を、抗SeV抗体を用

いたウェスタンブロッティングにより解析した。

図9は、ウイルス遺伝子の細胞内発現を示す写真である。シクロヘキシミド存在下、野生型SeVまたはSeV/mSfをmoi 100 pfuでCV1細胞に感染させた。接種後12時間にRNAを抽出し、ノーザンハイブリダイゼーションにより解析した。検出された特異的バンドは、BAS 2000イメージアナライザーを用いて解析した。

図10は、多段増殖連続共継代における野生型SeVおよびSeV/mSfの競合アッセイの結果を示す写真である。(A) 特異的プライマー対(左)と検出されるいずれかのウイルスRNA(右)を示す。(B) 初期濃度を、 10^4 (SeV/mSf) および 10^4 (野生型SeV) pfu/卵、または 10^4 (SeV/mSf) および 10^2 (野生型SeV) pfu/卵で接種し、継代を行った。接種後3日ごとにしょう尿液を回収し、 10^{-6} に希釈した後、新しい卵に共接種することを繰り返し、10回継代を行った。ウイルスRNAを抽出し、特異的プライマーセットを用いた1ステップPCR法で解析した。継代回数を図の上を示す。「野生型SeV」および「SeV/mSf」はそれぞれの配列を増幅できる特異的プライマー対を用いて増幅されたDNA断片を表している。

図11は、野生型SeVおよびSeV/mSfを感染させた正常BALB/cマウスおよび胸腺を欠損するBALB/c (nu/nu) マウスの体重増加を示す図である。5匹のマウスに経鼻接種でさまざまな量のウイルス (10^4 から 10^7 pfu/マウス) を感染させた。マウスの体重増加を感染14日後まで毎日グラムで測定した。死亡したマウスは「†」で示した。

図12は、BALB/cマウスおよびBALB/c (nu/nu) マウスの肺病変と肺内ウイルス量を示す図である。それぞれのマウスに 10^4 pfuのウイルスを経鼻接種した。これらのマウスは感染後0、1、2、3、5、7、および9日後に殺し、肺の病変スコア(上)、および肺内ウイルスタイター(下)を測定した。これらの値は各マウス個体ごとに示した。

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[実施例1] 組換えウイルスの構築とルシフェラーゼアッセイ

SeVの転写終結配列 (Eシグナル) の9ヌクレオチドは、全ての遺伝子上で正確に保存されている。一方、転写開始配列 (Sシグナル) の9ヌクレオチドには、わずかに相異がある。6つの遺伝子中、3つ (P、M、およびHN) の転写開始配列は 3'-UCCCACUUU-5' だが、N、F、およびLの遺伝子は、それぞれ 3'-UCCCAgUUU-5'、3'-UCCCuaUUU-5'、および 3'-UCCCACUua-5' である (図2)。これらのわずかな相異は、継代の経緯、毒性、単離方法に関わらず、全てのSeV株において完全に保存されている。転写開始配列のこれらのわずかな相異が持つ役割を解析するため、合成転写開始配列の調節下にルシフェラーゼを発現するSeV/SpLuc、SeV/SnLuc、SeV/SfLuc、SeV/SiLucと名付けた4つの組換えSeVを以下のようにして作成した。

1-1. N ORFの下流の挿入部位の作成

SeVのアンチゲノム全長cDNAコピーを含むプラスミド pSeV(+) (Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579) を、出発材料として、プラスミド構築を行った。まず、合成された転写終結配列および転写開始配列を持つルシフェラーゼ遺伝子を挿入するため、N遺伝子内のN ORFの下流にユニークなNotI部位を作り出した。NotI制限酵素認識部位を含む18ヌクレオチド (5'-gagggcccgcgccgcga-3' /配列番号: 1) を、N遺伝子の5' 非コード領域 (ネガティブセンス) にあるゲノムの3' 末端から1698ヌクレオチドおよび1699ヌクレオチドの間に挿入した (Shioda, T. et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:7317-7330) (図1)。挿入は、PCRを介した重複プライマー伸長法 (Ho, S. N. et al., 1989, Gene 77:51-59) による部位特異的変異導入法を用い、本質的には文献 (Hasan, M. K. et al., 1997, J. Gen. Virol. 78:2813-2820) に従って行った。簡潔に述べると、重複している18ヌクレオチドの末端を有する2つのプライマー (NmF; 5'-gagggcccgcgccgcga¹⁶⁹⁹TACGAGGCTTCAAGGTACTT¹⁷¹⁸-3' /配列番号: 2 および NmR; 5'-tcgcgcccgcggg

ccctc¹⁶⁹⁸TGATCCTAGATTCCTCCTAC¹⁶⁷⁰-3' /配列番号: 3)、それに2つの外側プライマー (OP1, 5'-⁶¹CAAAGTATCCACCACCCTGAGGAGCAGGTTCCAGACCCTTTGCTTTGC¹⁰⁵-3' /配列番号: 4 および OP2, 5'-²⁴⁶⁷TTAAGTTGGTVAGTGA²⁴⁴⁹-3' /配列番号: 5) を合成した。鋳型にpSeV(+)を用いて、まずOP1/NmFプライマー対、およびOP2/NmFプライマー対でPCRを行い、それぞれ1.6Kb および 0.8Kbの断片を得た。精製した1.6Kbおよび0.8Kbの断片を鋳型に、OP1/OP2プライマー対を用いて第2のPCRを行い、先の18ヌクレオチドを含む2.4Kbの単一のバンドを得た。2.4Kbの断片を精製して、SphIとSalIで切断した。pSeV(+)プラスミドをこれらの酵素によって、それぞれ、SeVゲノムの610位と2070位に対応する位置で切断した。得られた1.47Kbの断片の配列を、自動DNAシーケンサー AFLII(Pharmacia, Uppsala) を用いて確認し、もともとのpSeV(+)の対応する断片と置換した。このようにして、N ORFの下流にユニークな(唯一の)制限酵素部位を含むpSeV18c(+)を構築した。

これによって得られたNotI部位を含む18ヌクレオチドの挿入を持つプラスミドからは、親プラスミド pSeV(+)と同様に組換えウイルスの再構築が可能であり、生成したウイルスの感染性や複製能も pSeV(+)と同様であった。

1-2. さまざまな転写開始配列で制御されるルシフェラーゼ遺伝子のベクターへの挿入

pHv1ucRT4(-) (Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579) に含まれるホタル (*Photinus pyralis*) 由来のルシフェラーゼ遺伝子を、4種の異なる転写開始配列を含む以下の4つのプライマー対を用いたPCRで増幅した。すなわち、4つの順方向プライマー (ESp; 5'-TTgcggccgcGTAAGAAAACTTAGGGTGAAAGTTCACTTCACGATGGAAGACGGCAAAAACAT-3' /配列番号: 6、ESn; 5'-TTgcggccgcGTAAGAAAACTTAGGGTcAAAGTTCACTTCACGATGGAAGACGGCAAAAACAT-3' /配列番号: 7、ESf; 5'-TTgcggccgcGTAAGAAAACTTAGGGatAAAGTTCACTTCACGATGGAAGACGGCAAAAACAT-3' /配列番号: 8、およびESl; 5'-TTgcggccgcGTAAGAAAACTTAGGGTGAAtGTTCACTTCACGATGGAAGACGGCAAAAACAT-3' /配列番号: 9)、それに1つの共通の逆方向プライマー (Not

Lr; 5'-TCgcggccgcTATTACAATTTGGACTTTCCG-3' /配列番号: 10) を増幅に用いた。下線を引いた領域は、それぞれ、SeVの新しい転写終結配列と転写開始配列のセットで、保存された介在 (intergenic) トリヌクレオチドを間に持つ。下線のない小文字はNotI制限酵素認識部位を表す。下線部の小文字はそれぞれのプライマーにユニークなヌクレオチドを示す。ESp/NotLr、ESn/NotLr、ESf/NotLr、およびESl/NotLrプライマー対で増幅した1.7Kbの断片を精製し、NotIで切断し、pSeV18c(+)のNotI部位に直接導入した(図1)。最終構築物は用いた転写開始配列に従い、それぞれpSeV(+)SpLuc、pSeV(+)SnLuc、pSeV(+)SfLuc、およびpSeV(+)SlLucと名付けた。

1-3. cDNAからのウイルスの再構築

cDNAからのウイルスの再構築は、本質的には文献(Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579)に記載の方法に従った。簡単に述べると、直径6cmのプレートにLLCMK2細胞を 2×10^6 で播き、2 PFU/cellのmoiでワクシニアウイルス(vaccinia virus; VV) vTF7-3 (B. Moss博士より供与 (Fuerst, T. R. et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8122-8126)) を感染させた。その後、親株または変異を導入したpSeV(+) 10 μ gと、トランスに作用するタンパク質群をコードするプラスミド、pGEM-N (4 μ g)、pGEM-P (2 μ g)、およびpGEM-L (4 μ g) (Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579) を、リポフェクション試薬DOTAP (Boehringer-Mannheim, Mannheim) を用いて同時にトランスフェクトした。VVの細胞毒性が最小となり、再構築の比率が最大になるよう、細胞は40 μ g/mlのaraC (1- β -D-arabinofuranosylcytosine) と100 μ g/mlのリファンピシンを含む、血清不含のMEMにて維持した。トランスフェクション40時間後に細胞を回収し、冷凍と解凍を3回繰り返し細胞を破碎し、10日目の発育鶏卵に接種した。接種3日後、しょう尿液を回収した。回収したウイルスの力価は、文献(Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579)に従い測定し、赤血球凝集価(HAU)とPFU/mlで表した。10⁸から10⁹ pfu/mlの回収したSeVを含む卵のしょう尿液中に含まれるヘル

パーVVは、しょう尿液を 10^{-7} に希釈し、卵で2回目の継代を行って除去した。この2回目の継代をした溶液を -80°C で保存し、全ての実験において、種ウイルスとして使用した。

1-4. 細胞培養とウイルスの感染

サル腎臓由来の細胞株LLCMK2およびCV1は、10%のウシ胎児血清を含む最小必須培地 (MEM) で 37°C で培養した。これらの細胞の単層培養に、cDNAから再構築させた変異型ウイルスを moi 10 PFU/cellで感染させ、血清を含まないMEMで培養した。cDNAから再構築させた野生型SeV (Z株) (Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579) も対照として用いた。

CV1細胞における複製を測定したところ、4種の組換えウイルスは、野生型に比べ複製速度が遅いことが判明した。これは、おそらく追加された1,728塩基の遺伝子によるものと考えられる (Hasan, M. K. et al., 1997, J. Gen. Virol. 78:2813-2820)。4種の組換えウイルスの中で、SeV/SfLucの複製が最も遅いことが判明した。

1-5. ルシフェラーゼ解析

それぞれの組換えSeVから発現されるルシフェラーゼの活性を比較した。6ウェルプレート中の 5×10^5 cells/ウェルのCV1細胞に様々な感染価でウイルス (1~300pfu/細胞) を感染させ、SeVのルシフェラーゼ活性の発現を測定した。一回の増殖サイクルがまわる条件では、感染後 0、6、14、20、および26時間に細胞を回収した。回収した細胞のルシフェラーゼ活性は、ルシフェラーゼアッセイキット (Promega, Madison) を用い、ルミノメーター (Luminos CT-9000D, Dia-Iatron, Tokyo) によって文献 (Hasan, M. K. et al., 1997, J. Gen. Virol. 78:2813-2820; Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579) に記載の方法に従って計測した。

その結果、どの組換え体においても、感染時間と感染量に比例して、SeVから発現されるルシフェラーゼ活性の上昇が観察された。感染価 (moi) 10でCV1細胞に

感染させた場合のルシフェラーゼ活性の変化を図3に示す。

これらの細胞を回収し、ルシフェラーゼ cDNAをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。ノーザンハイブリダイゼーションは以下のように行った。細胞からTRIzol (Gibco BRL, N. Y.) を用いてRNAを抽出した。RNAをエタノールで沈殿させ、ホルムアミド/ホルムアルデヒド溶液中に溶解させた。これを0.9%アガロース-ホルムアミド/MOPSゲルで電気泳動し、Hibond-Nフィルター (Amersham, Buckinghamshire) へキャピラリー・トランスファーを行った。フィルターは、multi-prime labeling kit (Amersham, Buckinghamshire) で³²Pラベルしたプローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。ルシフェラーゼプローブとしては、NarI/HincII (1270bp) 断片を、pHvLucRT4 (Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579) から精製して用いた。その結果、ルシフェラーゼ mRNAはモノシストロニックmRNAとして合成されることが確認された。

これらのことから、ルシフェラーゼORFの直前に挿入した合成された転写終結配列および転写開始配列は、ウイルスのRNAポリメラーゼにより正しく認識されることが実証された。しかしながら、これら4種のウイルスを感染させた細胞におけるルシフェラーゼ活性の値は、同じ条件にも関わらず異なっていた。感染26時間後においては、SeV/S1Lucに感染した細胞が最も高い活性を示し、SeV/SfLucに感染した細胞が最も低い活性を示した(図3)。SeV/SpLucとSeV/SnLucはSeV/S1Lucよりも感染26時間後においてわずかに低い活性を示した。しかし、この差は感染14時間後および感染20時間後では見られなかった。このことから、Sp、Sn、およびS1の再開始能は同等であると考えられる。

[実施例2] 組換えウイルスからの初期転写量の比較

実施例1で観察された4種の組換えSeV間の発現量の相異が主に転写レベルの違いによるものなのか、それとも複製過程によるものなのかを調べるため、CV1細胞に組換えウイルスを感染させ、シクロヘキシミドを添加する実験を行った。シクロヘキシミドは蛋白質合成を阻害するため、新規なウイルス蛋白質の合成が

必要なウイルス複製は阻害される。このような条件下では、ウイルス粒子に内在するRNAポリメラーゼによりウイルスの初期 (primary) 転写のみが行われる。

実施例 1 と同様に CV1 細胞に組換えウイルスを $\text{moi}=100$ で感染させ、感染細胞を $100 \mu\text{g/ml}$ のシクロヘキシミド (Sigma, St. Louis) 存在下で 12 時間インキュベートした。細胞を回収後、上記の通りウイルス RNA を調製し、ルシフェラーゼ cDNA をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った (図 4 上)。別の細胞では、さらにシクロヘキシミド非存在下で 0、2、および 4 時間インキュベートして蛋白質を合成させ、ルシフェラーゼ活性を測定した。

その結果、いずれの組換えウイルスを感染させた細胞でも、シクロヘキシミドを除いてからのインキュベーション時間が長くなるほど、ルシフェラーゼ活性の増加が見られた。しかしここでも、SeV/SfLuc が他の 3 つに比べルシフェラーゼの発現が有意に低かった (図 4 下)。各ウイルスを感染させた細胞でのルシフェラーゼ mRNA 量は、ルシフェラーゼ活性とよく相関していた。4 時間後のルシフェラーゼ活性を、6 つの遺伝子のうち 3 つで共通している SeV/SpLuc 型の転写開始配列での値で標準化した。その結果、SeV/SnLuc および SeV/SfLuc 感染細胞のルシフェラーゼ活性は、それぞれ 0.86 および 1.19 であり、SeV/SpLuc とほぼ同等であった。それに対し、SeV/SfLuc に感染した細胞での値は対照のわずか 0.24 であった。

これらの結果から、F 遺伝子の発現に用いられているシグナルは、他の転写開始配列に比べ再開始能が低いことが強く示唆される。

[実施例 3] F 遺伝子の転写開始配列が改変された SeV 変異体

上記の結果は、天然の SeV ゲノムでは F 遺伝子の転写が抑制的に調節されていることを示唆している。これをさらに調べるため、F 遺伝子の転写開始配列を P/M/HN 遺伝子型に改変した変異体 SeV (SeV/mSf) を以下のようにして作成し、その複製を野生型と比較した。

3-1. F 遺伝子の転写開始配列が改変された全長 SeV cDNA の変異体の作製

以下のように F 遺伝子の転写開始配列上に変異を導入し、2 つのヌクレオチドを

置換した。まず、pSeV(+)を、BanIIIを用いてSeVゲノム上の2088位と5333位を切断し、3.4Kbの断片をpBluescript KS(+) (Stratagene, La Jolla) の同じ制限酵素認識部位に再クローン化し、pB/BanIIIを作製した。その後、PCR-mediated重複プライマー伸長法 (Ho, S. N. et al., 1989, Gene 77:51-59) を用いて、上記したと同様に部位特異的変異を導入した。簡単に述べると、2つのプライマー (mGS1F; 5' -⁴⁸¹⁰CTTAGGGTGAAGTCCCTGT⁴⁸³⁰-3' / 配列番号 : 11 および mGS1R; 5' -⁴⁸³⁰ACAAGGGACTTTCA⁴⁸¹⁰CCCTAAG⁴⁸¹⁰-3' / 配列番号 : 12) と 2つの外側プライマー (M1F; 5' -³⁹³¹TACCCATAGGTGTGGCCAAAT³⁹⁵¹-3' / 配列番号 : 13 および T7; 5' -TAATACGACTCACTATAGGGC-3' / 配列番号 : 14) を合成した。下線を付けた文字は、変異を導入した部位を表す。最初のPCRは、鋳型としてpB/BanIIIを用い、M1F/mGS1Rプライマー対およびT7/mGS1Fプライマー対で行い、それぞれ0.9Kbおよび0.6Kbの断片を得た。これらの2つの断片を精製し、鋳型として用いて、2回目のPCRをM1F/T7プライマー対で行い、2つのヌクレオチドの変異を有する、1.5Kbの単一の断片を得た。この断片を精製し、BanIIIで切断し、pSeV(+)の同じ制限酵素認識部位に再クローン化し、pSeV(+)mSfを作製した。クローン化した配列は、塩基配列を決定して確認した。cDNAからのウイルスの再構築は、実施例1と同様にして行った。

このウイルスの増殖をCV1細胞を用いて調べたところ、SeV/mSfは野生型SeVよりも速く増殖することが判明した (図5)。トリプシン非存在下では丸い細胞やはがれた細胞が観察され、またプロテオリシスによりF糖蛋白質を活性化する外来のトリプシン存在下では、融合した細胞が、変異型において有意に多く観察された。これらのことから、SeV/mSfにおいては細胞傷害性が増加していることが明らかとなった (図6)。

3-2. SeV/mSfの遺伝子群の発現

野生型SeV、および変異SeV (SeV/mSf) を moi=10 で感染させたCV1細胞の、感染後さまざまな時間におけるmRNAレベルを、実施例1と同様のノーザンブロッテ

イングにより調べた。ただし、センダイウイルスのNプローブについては、PstI/PvuI (1189bp) 断片をpGEM-Nから精製して用いた。Pプローブに関しては、SmaI/SmaI断片の792bpをpGEM-Pから精製して用いた。M、F、HN、およびLプローブに関しては、それぞれNdeI/NdeI (878bp)、BamHI/BamHI (902bp)、ScaI/ScaI (1108bp)、およびBamHI/BamHI (1654bp) 断片を、pSeV(+)から精製して用いた。

図7に示すように、SeV/mSfのFおよびL転写産物は、野生型を感染させた場合と比べ早く検出され、明らかに高いレベルに達した。PおよびN転写産物も、SeV/mSf感染の方が早く検出されたが、ピークのレベルは野生型と同程度であった。

感染細胞におけるウイルス蛋白質の発現を確認するため、抗SeV抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。すなわち、6ウェルのプレートで増殖させたCV1細胞 (2×10^5) に、野生型またはSeV/mSfを10 moiで感染させ、感染後、さまざまな時間に細胞を回収した。遠心分離により細胞を沈殿させ、細胞のペレットを溶解後に12.5%のSDS-PAGE (Laemmli, U.K., 1970, Nature 227:680-685) で解析し、抗SeVウサギ血清を用いて、文献 (Kato, A. et al., 1995, Virology 209:480-488; Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579) に記載の方法に従いウェスタンブロッティングを行った。その結果、SeV/mSf感染細胞でのF₀蛋白質のレベルは、感染後のいずれの時点においても野生型よりも有意に高かった (図8)。下流の遺伝子産物である HNおよびLはこの実験では十分に分離できなかった。

転写レベルを直接比較するため、野生型SeVまたはSeV/mSfのいずれかに感染させた細胞をシクロヘキシミド処理により新規の蛋白質合成をブロックした後にRNAを抽出し、上記のノーザンハイブリダイゼーションにより解析した。ハイブリダイズしたバンドに含まれるウイルスゲノムRNAの放射性活性を、BAS2000イメージアナライザー (Fujifilm, Tokyo) を用いて解析した。その結果、変異SeVにおいて FおよびL遺伝子の発現が増強され、NおよびP遺伝子は増強されないという現象が観察された (図9)。これらの結果から、天然のF遺伝子転写開始配列の再開

始活性は低く、F遺伝子やその下流の遺伝子群の発現が抑制的に調節されていることが裏付けられた。そして、F遺伝子の転写開始配列を高い効率の転写開始配列に置換することで、F遺伝子のみならず、その下流の遺伝子群の転写レベルも上昇させられることが示された。SeV/mSfにおいては、おそらくL遺伝子の発現が増強されたため、感染の全過程において、変異型では野生型に比べビリオン(v) RNAのレベルが上昇したと考えられる(図7)。図7からわかるように、変異型SeVの感染でmRNAがより早く検出されたが、これはL遺伝子の発現が増加したためと思われる。

[実施例4] 発育鶏卵での野生型SeVとSeV/mSfの連続共継代

CV1細胞では、図5に示したように、1段増殖試験の場合にはSeV/mSfに比べ野生型の方が複製速度が遅かったが、ゆっくりと多段増殖する場合には、天然に見られるようにF遺伝子やその下流の遺伝子群の転写が抑制的に調節されている方が、人工的に上方に調節するように作出したものよりも有利であることも考えられる。そこで、野生型SeVおよびSeV/mSfの2つのウイルスを卵で連続共継代(successive co-passage)して多段増殖させる条件で、一方が他方を駆逐するかを調べた。

まず2つの発育鶏卵に、SeV/mSfおよび野生型SeVを、それぞれ 10^4 pfu/eggおよび 10^4 pfu/eggで同時に接種した($10^4 : 10^4$ 接種)。別の実験ではSeV/mSfおよび野生型SeVを、それぞれ 10^4 pfu/eggおよび 10^2 pfu/eggで同時に接種した($10^4 : 10^2$ 接種)。接種後3日毎にしょう尿液を回収し、 10^{-6} に希釈後、0.1mlを新しい卵へ再接種した。これらの再接種は10回まで続けた。各しょう尿液からTRIzol/LS(Gibco BRL, N.Y.)を用いて、実施例1と同様にウイルスRNAを抽出し、2組の特異的なプライマー対を用いた1ステップRT-PCR法により増幅し、しょう尿液中の増殖したウイルスを、特異的なプライマー対を用いたRT-PCRにより半定量的に測定した。1つのプライマー対は、F遺伝子に野生型転写開始配列(AGGGatAAAG)をもつ断片のみを増幅することができ、他方のプライマー対は変異型転写開始配列

(AGGGtgAAAG) をもつ断片のみを増幅するようにした(図1 OA)。具体的には、しょう尿液25 μ lから抽出したRNAを、SuperscriptII (Gibco BRL, N.Y.) を用いて50°Cで30分間、HvMプライマー (5' -⁴⁴⁴⁸TTTTCTCACTTGGGTTAATC⁴⁴⁶⁷-3' /配列番号:15) で逆転写させ、2分間94°Cで熱変性させた。SeV/mSfの検出についてはプライマー HvMおよびGS2WR (5' -⁴⁸³⁶GCACTCACAAGGGACTTTca⁴⁸¹⁷-3' /配列番号:16) を用いて、また野生型 SeV の検出についてはプライマー HvM と GS2MR (5' -⁴⁸³⁶GCACTCACAAGGGACTTTat⁴⁸¹⁷-3' /配列番号:17) を用いて、文献 (Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587; Kuronati, A. et al., 1998, Genes Cells 3:111-124) に記載の方法に従って、cDNAをPCRにより増幅した。小文字は変異させた2ヌクレオチドを示す。それぞれに特異的な産物は、アガロースゲルでの電気泳動により上記に記載の通り解析した。

図1 OBに示すように、 $10^4 : 10^4$ の接種においては、野生型ゲノムは8回目の継代で消失し、 $10^4 : 10^2$ の接種においては、5回目で消失することが判明した。対照実験では、各ウイルスを個別に継代し、ゲノム配列を決定した。その結果、これら2種のゲノムは安定であり、10回の継代の間、配列を決定した領域に塩基の変異は見られなかった。これらのデータは、天然のF遺伝子の転写開始配列は、少なくとも卵 (in ovo) を用いた多段増殖試験においてはSeVの複製に有利ではないことを示している。

[実施例5] マウスにおけるSeV/mSfの病原性

自然の宿主であるマウスでのSeVの感染による個体レベルの病原性の発揮には、培養細胞や卵に比べはるかに複雑な条件が必要である。そこでマウスにおいて変異SeV/mSfが野生型よりも早く複製し、より高い病原性を示すかを調べた。

SPF (specific pathogen-free) の3週齢 BALB/cマウスおよび4週齢のヌードマウス BALB/c (nu/nu) を日本Charles-Riverから購入し、ウイルス感染実験に供した。マウスをエーテルで軽く麻酔し、野生型またはSeV/mSfを 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、または 10^8 pfu/マウスで鼻腔内に感染させた (Kiyotani, K. et al., 1990,

Virology 177:65-74)。マウスの体重は14日目まで1個体ごとに毎日計測した。10⁴ pfuを接種したBALB/cおよびヌードマウスについては、感染後 0、1、3、5、7、および9日目に、それぞれのグループから3匹のマウスを取りだし、屠殺して肺内ウイルスの力価を測定した。肺の病変スコアも同時に決定した (Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587)。その結果を図11に示す。

10⁷ pfuのウイルスを接種した場合、どちらのウイルスの接種もマウスの体重増加を強く阻害した。どちらのウイルスの場合も、感染後似たような日数ですべてのマウスが死亡した。10⁶ pfuの接種では2種のウイルスに有意な違いが見出された。SeV/mSfの感染は野生型の感染に比べ、体重増加に対しより強い影響を示した。SeV/mSfの接種ではすべてのマウスが死亡したが、野生型の接種では死亡したのは1個体のみで残りは再び体重が増加した。10⁵ pfuの接種では、野生型を接種したすべてのマウスで非接種マウスと同等の体重増加を示し生存したが、SeV/mSfの接種ではあいかわらず体重増加が阻害され、半数以上のマウスが死亡した。従って、SeV/mSfは野生型よりも病原性が高いことが明らかとなった。病原性の違いを50%致死となる用量 (LD₅₀) で定量化したところ、野生型では 1.78×10⁶ pfuであり、SeV/mSfでは 7.94×10⁴ pfuであった (表1)。従って、BALB/c系統においては、変異SeVは野生型よりも22倍病原性が高いことが判明した。

表1 正常およびnudeマウスにおける野生型および変異ウイルスのLD₅₀

接種		BALB/C	LD ₅₀	BALB/C(nu/nu)	LD ₅₀
野生型	10 ⁸	5/5 ^a		NT	
	10 ⁷	5/5		3/5	
	10 ⁶	1/4	1.78x10 ⁶	2/5	3.16x10 ⁶
	10 ⁵	0/5		NT	
	10 ⁴	0/5		0/5	
SeV mS/F	10 ⁸	5/5		NT	
	10 ⁷	5/5		5/5	
	10 ⁶	5/5	7.94x10 ⁴	5/5	7.94x10 ⁴
	10 ⁵	3/5		3/5	
	10 ⁴	0/5		0/5	

^a 死亡個体/接種個体

細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) はSeVの病原性を2つの方法で改変する。すなわちCTLは、一方では身体からウイルスを消滅または消失させるように働き、他方では免疫病理学的過程による病状の進行を加速するように働く。すなわち、BALB/cマウスでの実験結果は、変異SeVがマウス個体内で高い増殖性を示したことによる直接的効果よりも、結果的により強い免疫を誘導したために間接的に病状が悪化した可能性が考えられる。そこで、胸腺欠損nudeマウスにおける野生型ウイルスと変異ウイルスの病原性を調べ、免疫誘導による病原性悪化の可能性の否定を試みた (図11)。その結果、各ウイルスのLD₅₀はnudeマウスと親の正常マウスとの間に違いが認められず、nudeマウスにおいても2つのウイルスで同程度 (～40倍) の違いが認められた (表1)。これらの結果から、少なくともLD₅₀に基づく限り、観察期間 (14日) の間は、野生型ウイルスおよび変異ウイルス両者の病原性にCTLは主要な役割を果たしていないことが示唆される。しかしながら、野生型ウイルスおよび変異ウイルス両者共、親マウスではウイルスが消失した後にも、nudeマウスでは全過程で肺内にウイルスが存続していた (図12)。これらの結果は、CTLおよび他の胸腺依存的な応答が、ウイルスの病理において少なくとも部分的な役割を果たしていることを示唆する。

以上の結果から、天然のF遺伝子の転写開始配列はSeVの複製をある程度抑制することで感染したマウスをより長期間生存できるようにしていることが示唆される。

産業上の利用の可能性

本発明により転写開始配列が改変されたパラミクソウイルス科ウイルスベクターが提供された。本発明のウイルスベクターは、転写開始配列の改変により、野生型ウイルスと比較して、ゲノム上の遺伝子の転写レベルが改変されている。これらのウイルスは、増殖力を上昇させるために、また所望の外来遺伝子の発現を上昇させるために有用である。このようなウイルスベクターは、産物の生産効率

が向上するという利点を有する。逆に、あまり高い発現が好ましくない蛋白質の場合には、F遺伝子の転写開始配列のような再開始活性の低い転写開始配列の下流に該蛋白質をコードする遺伝子を連結することで発現量を制限することが可能である。また、医薬品組成物やワクチンとして、組換えウイルス粒子またはウイルス様粒子を回収する場合、増殖力が上昇するように転写開始配列が改変されたゲノムを持つウイルスでは、短期間で多量のウイルスを回収することが可能であるという利点を有している。

請求の範囲

1. パラミクソウイルス科ウイルスのゲノム上の少なくとも1つの遺伝子の転写開始配列が改変されることにより、宿主内における該遺伝子およびその下流の遺伝子の発現量が改変された、ウイルスベクターDNA。
2. 転写開始配列の改変が、パラミクソウイルス科ウイルスの他の遺伝子の転写開始配列への置換である、請求項1に記載のウイルスベクターDNA。
3. 転写開始配列の改変が、F遺伝子の転写開始配列の、他の遺伝子の転写開始配列への置換である、請求項1に記載のウイルスベクターDNA。
4. 他の遺伝子の転写開始配列がP/M/HN遺伝子型の転写開始配列である、請求項3に記載のウイルスベクターDNA。
5. F遺伝子および／またはHN遺伝子が欠損している、請求項1から4のいずれかに記載のウイルスベクターDNA。
6. 外来遺伝子が挿入されている、請求項1から5のいずれかに記載のウイルスベクターDNA。
7. 請求項1から6のいずれかに記載のウイルスベクターDNAからの転写産物をウイルス粒子内部に含む、パラミクソウイルス科ウイルスベクター。
8. センダイウイルスベクターである、請求項7に記載のベクター。
9. 天然型ウイルスと比較して宿主における増殖能力が高まっている、請求項7または8に記載のベクター。
10. 請求項1から6のいずれかに記載のウイルスベクターDNAを宿主に導入し、該宿主内でウイルスタンパク質を発現させる工程を含む、パラミクソウイルス科ウイルスベクターの調製方法。
11. パラミクソウイルス科ウイルスがセンダイウイルスである、請求項10に記載の方法。

图 1

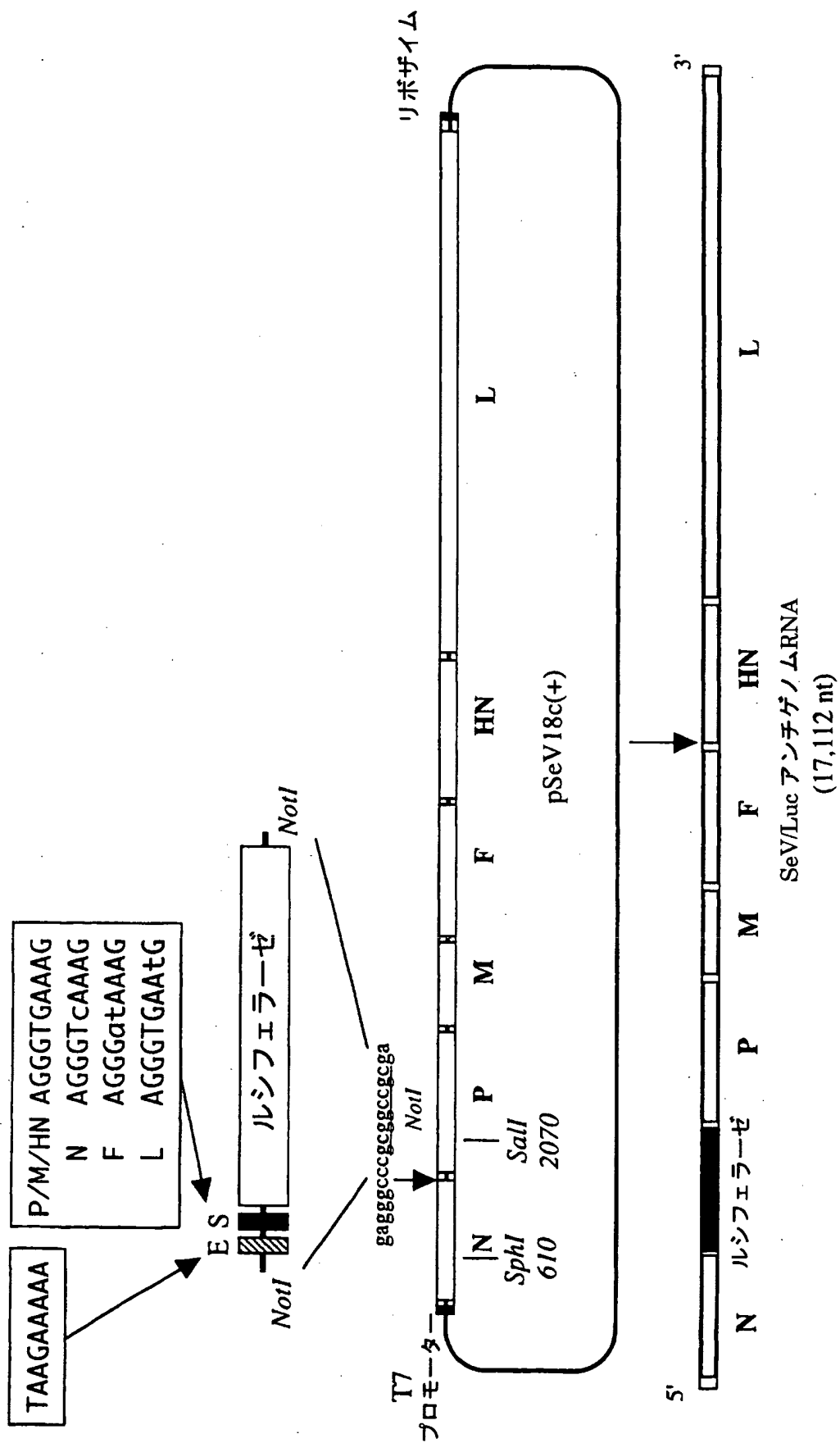


図 2

15,384 nt

リ-タ- N P/V/C M F HN L トレ-ラ-

ACCAAACAGG AGAAAAACA TGTATGGGAT ATGTAATGAA GTTATACAGG ATTTT

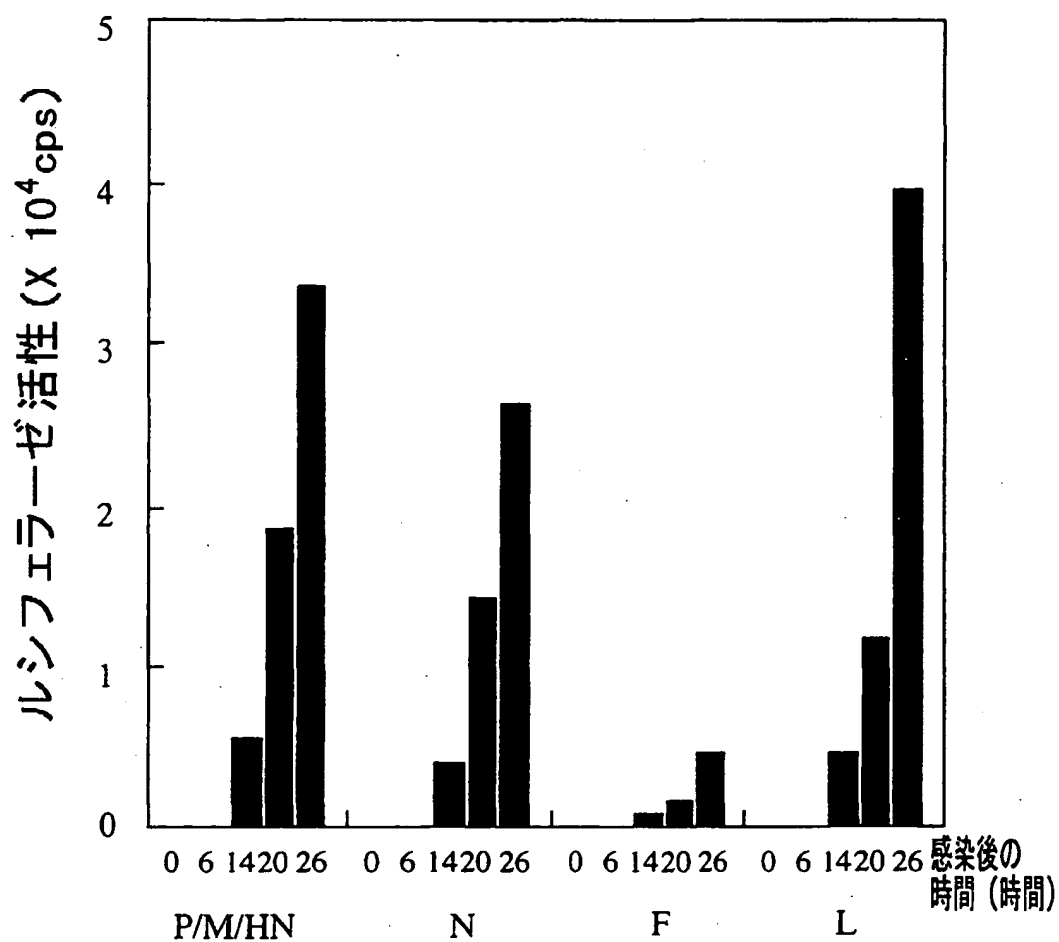
AGGGICAAAG	TATC	---	N	---	TAG	TAAGAAAAA	CTT
AGGGIGAAAG	TICA	---	P	---	GAT	TAAGAAAAA	CTT
AGGGIGAAAG	AAAT	---	M	---	AAA	TAAGAAAAA	CTT
AGGGATAAAG	TCCC	---	F	---	TAA	TAAGAAAAA	CTT
AGGGIGAAAG	TGAG	---	HN	---	TAT	TAAGAAAAA	CCC
AGGGICAAATG	CGAA	---	L	---	TAG	TAAGAAAAA	CTT

ACAAGAAGAC AAGAAATTT AAAAGGATA CATATCTCTT AAACCTCTGTCTGG T

S	遺伝子	E	IG
----------	-----	----------	-----------

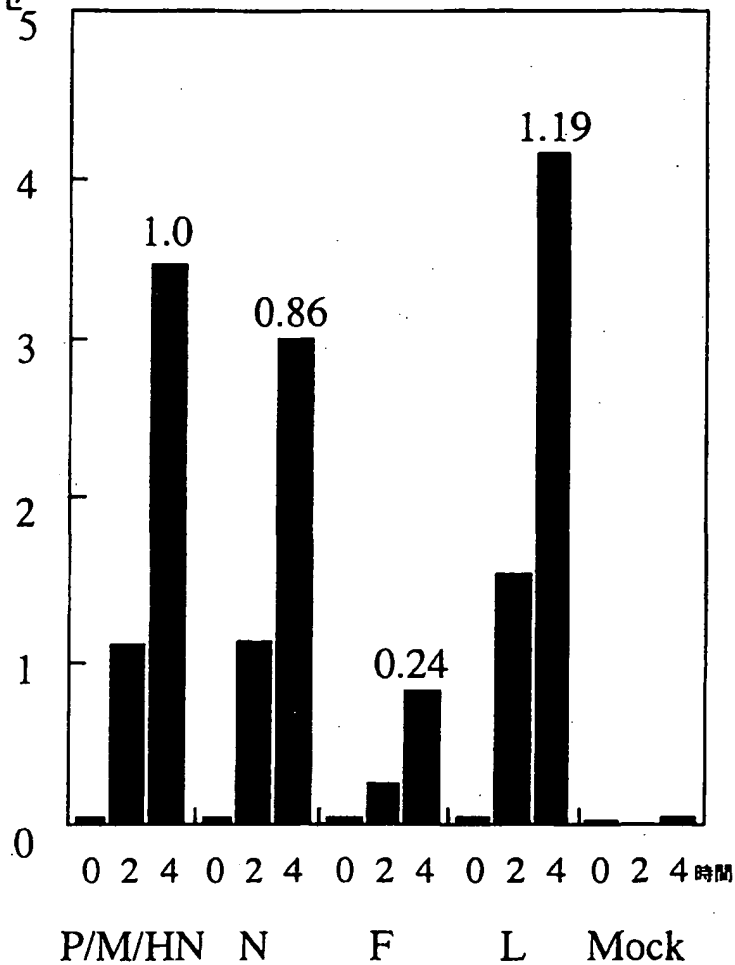
3 / 12

図 3



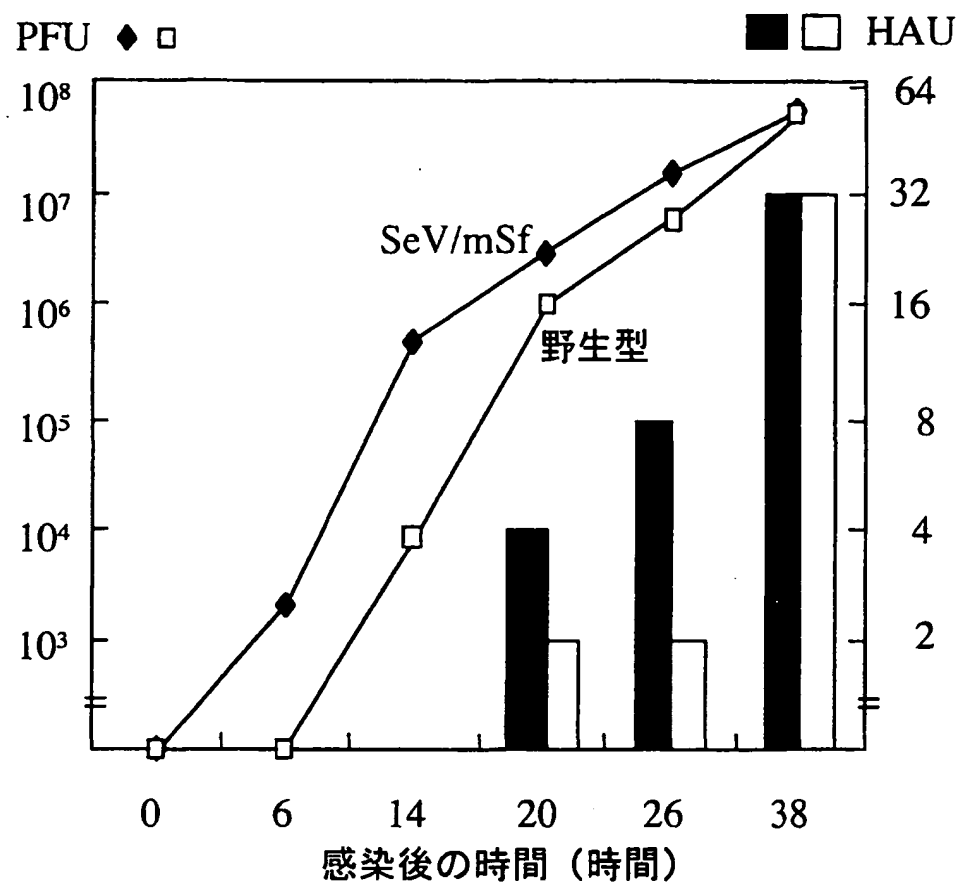
4 / 12

図 4

ルシフェラーゼ
mRNAルシフェラーゼ
活性
($\times 10^3$ cps)

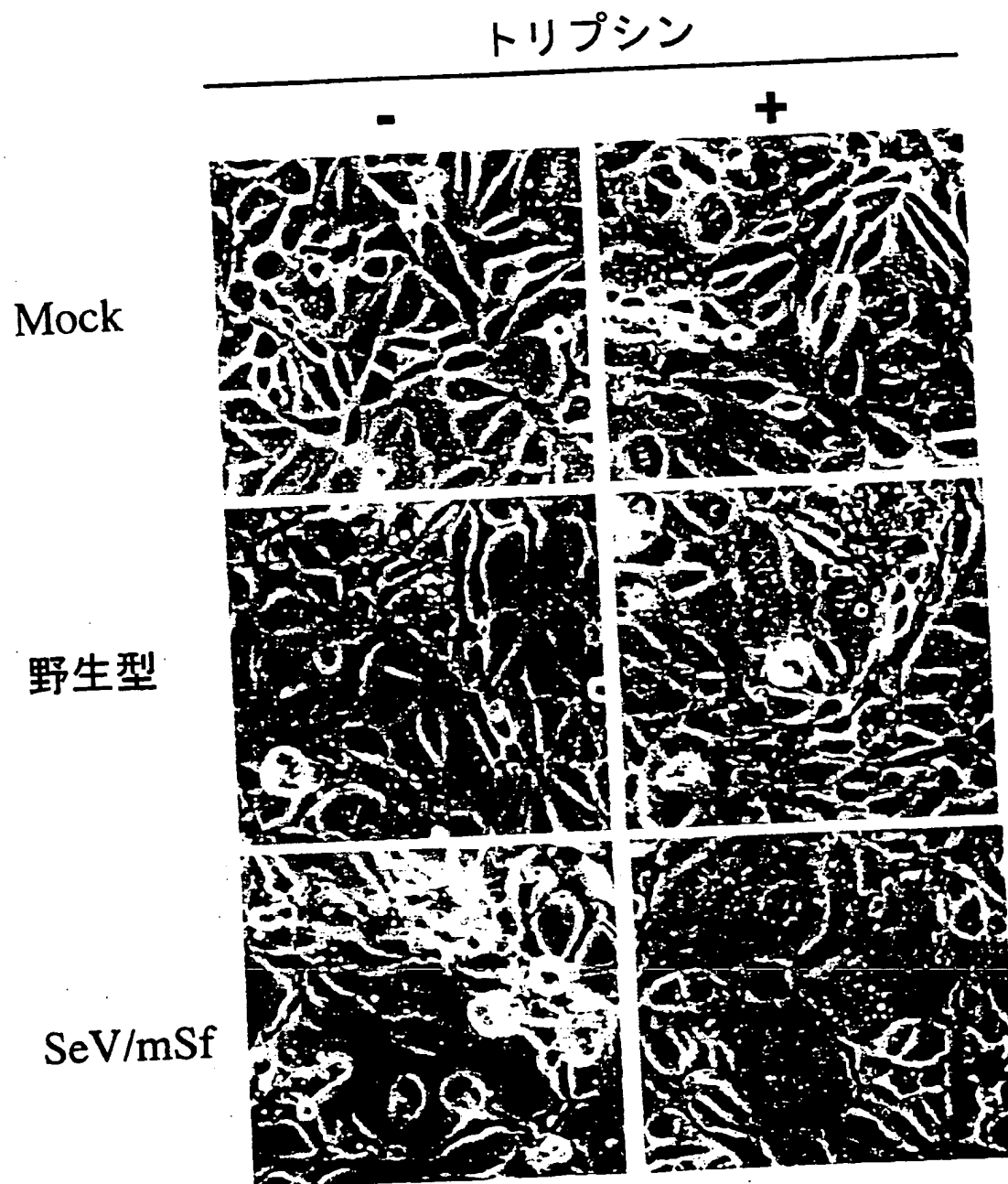
BEST AVAILABLE COPY

図 5



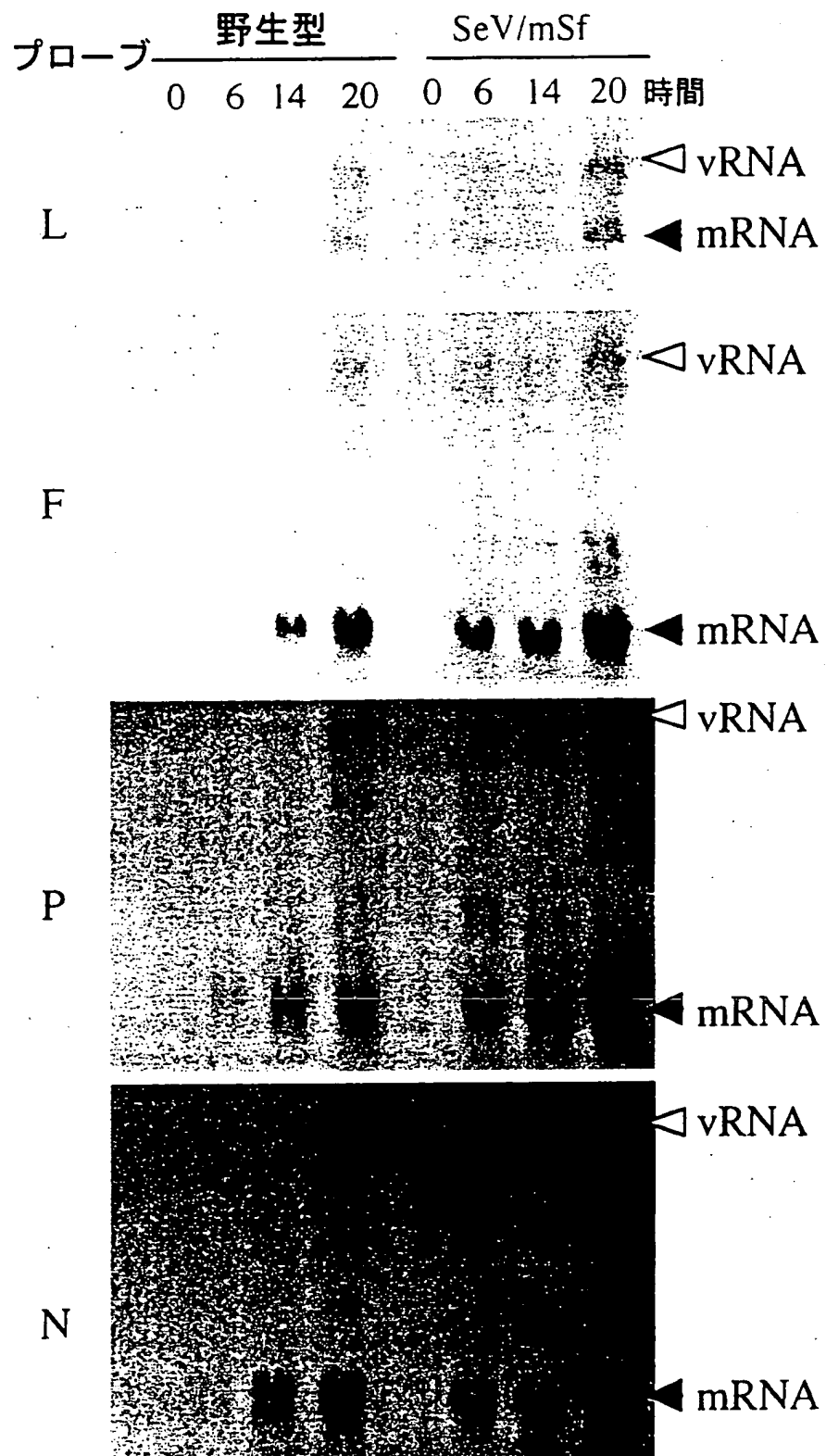
6/12

図6



BEST AVAILABLE COPY

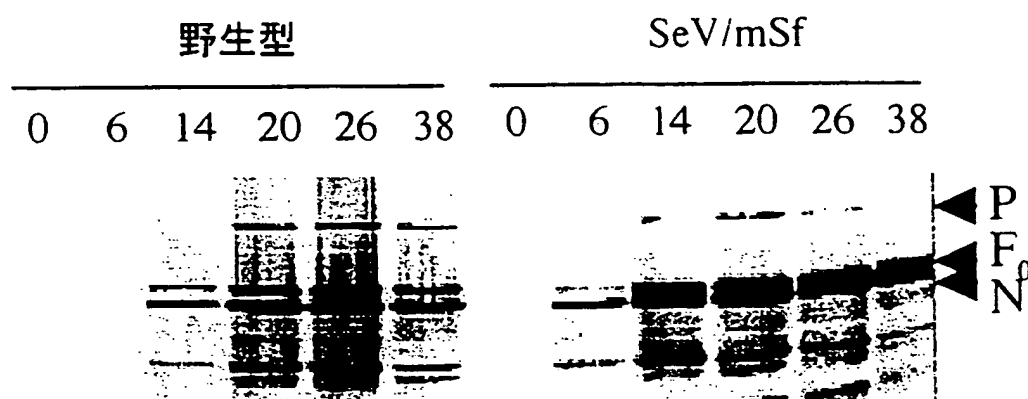
図 7



BEST AVAILABLE COPY

8/12

図8



BEST AVAILABLE COPY

図 9

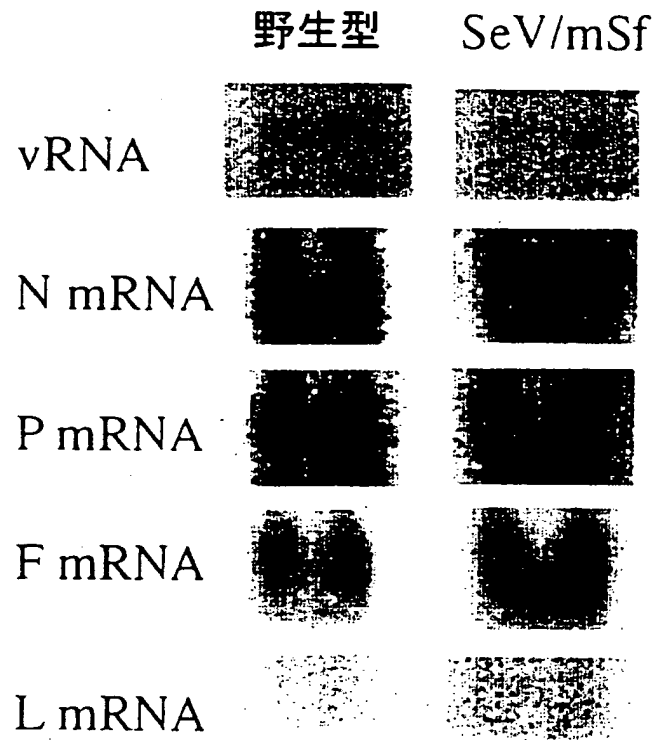


図 10

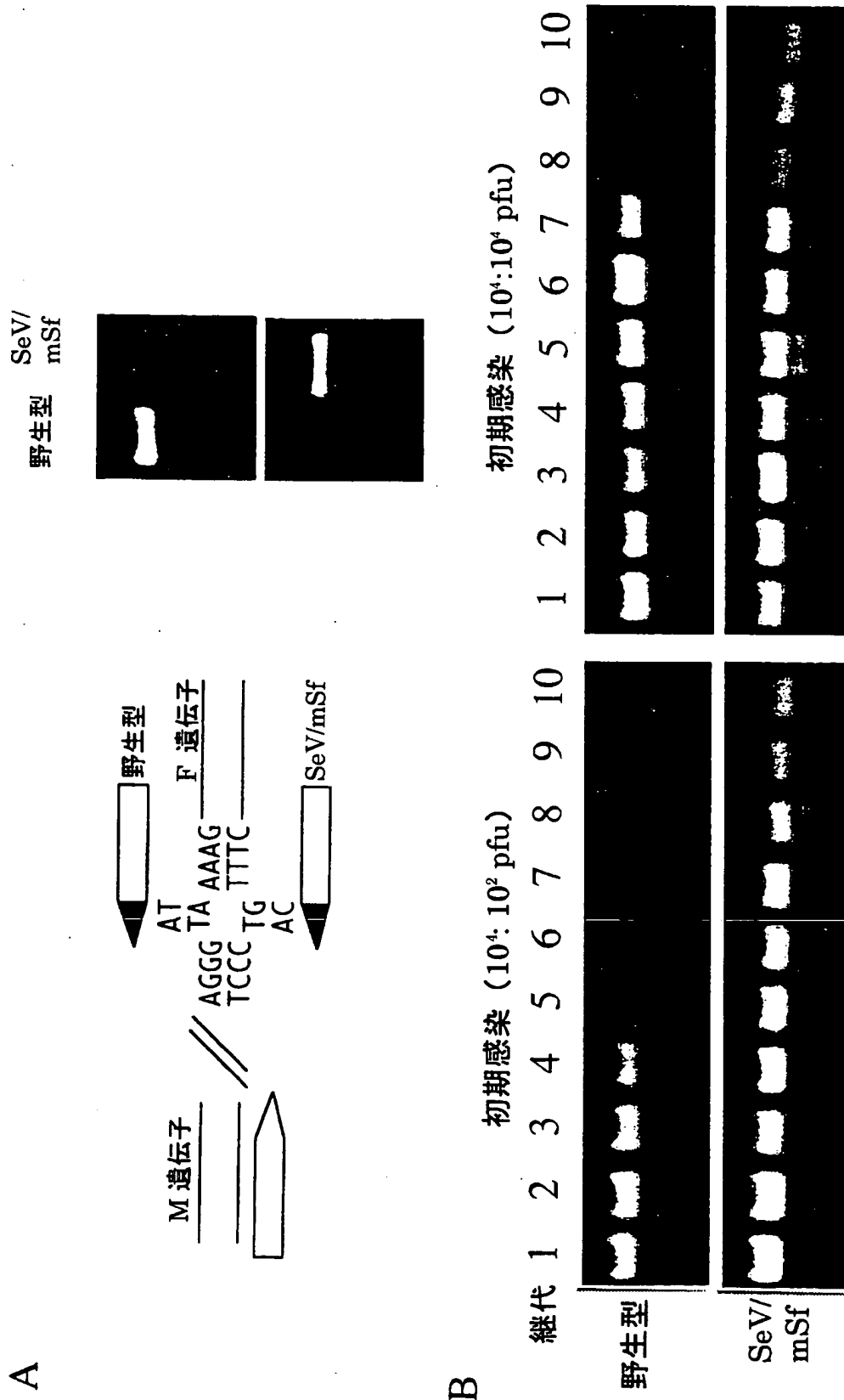


図 11

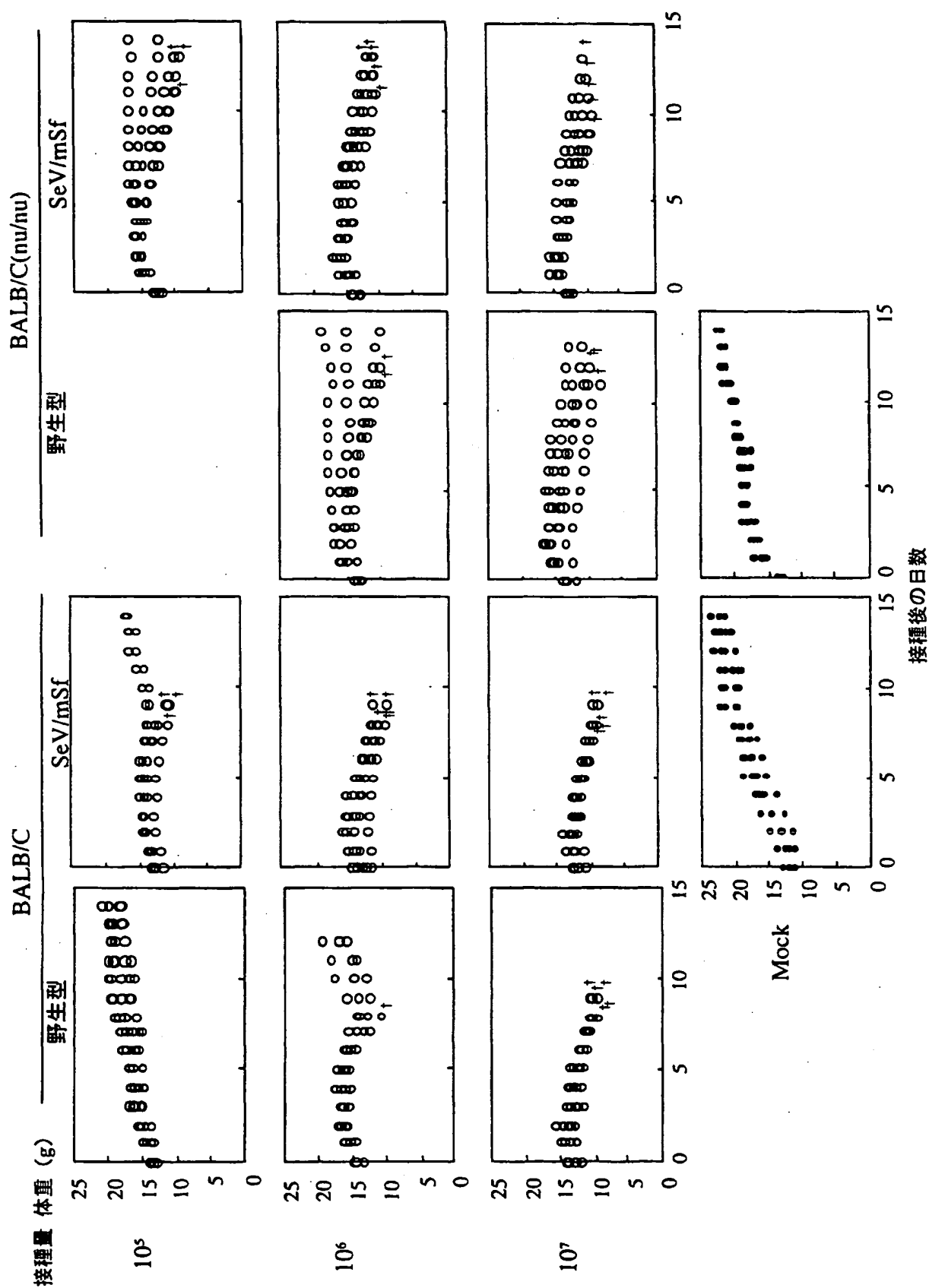
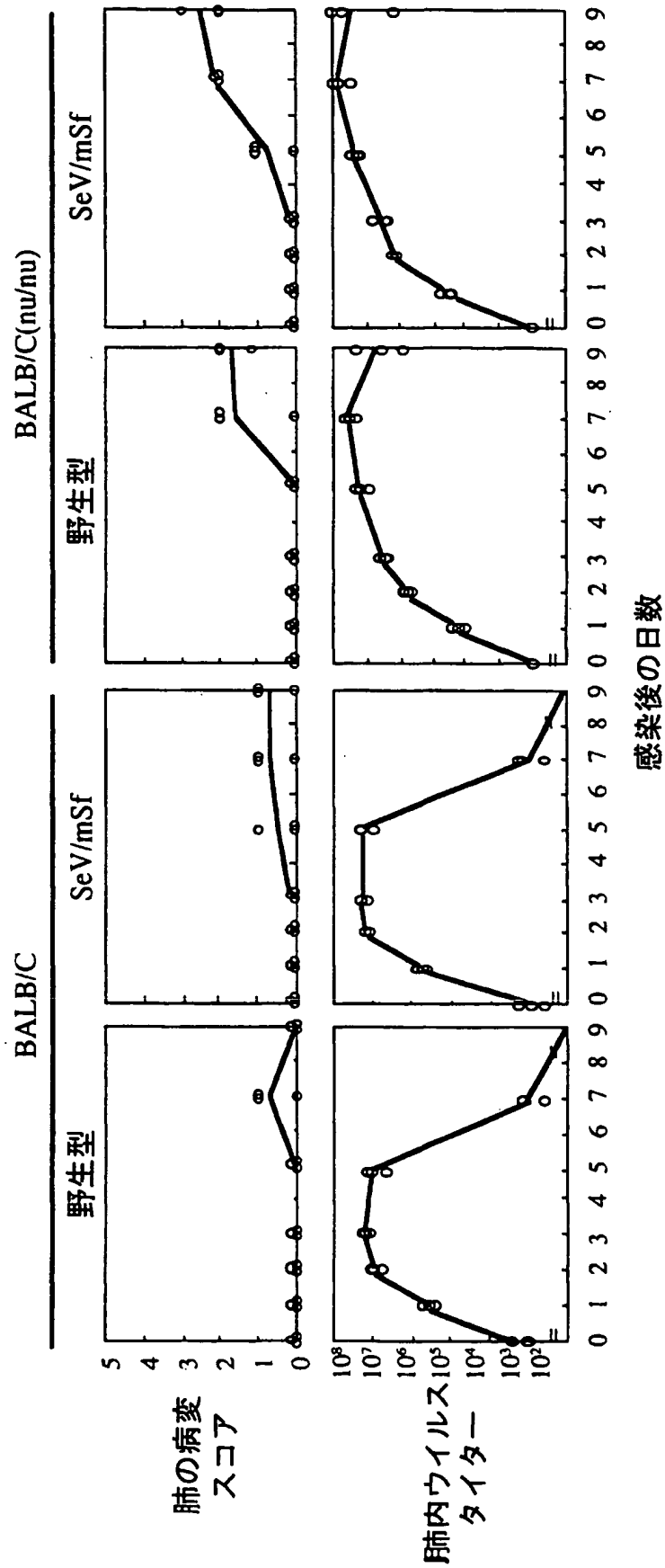


図 12



SEQUENCE LISTING

<110> DNAVEC Research Inc.

<120> Paramyxoviruses with alternative transcription start signals

<130> D3-007PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-252231

<151> 1999-09-06

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized oligonucleotide sequence

<400> 1

gagggcccgcc ggccgcga

18

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 2

gagggcccgcc ggccgcgata cgaggettca aggtactt

38

<210> 3

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 3

tcgcggccgc gggccctctg atcctagatt cctcctac

38

<210> 4

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 4

caaagtatcc accaccctga ggagcagggt ccagaccctt tgctttgc

48

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 5

ttaagttggt vagtgactc

19

<210> 6

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially synthesized primer sequence

<400> 6

ttgcggccgc gtaagaaaaa cttagggtga aagttcactt cacgatggaa gacggcaaaa
acat

60
64

<210> 7

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 7

ttgcggccgc gtaagaaaaa cttaggtca aagttcactt cacgatggaa gacggcaaaa 60
acat 64

<210> 8

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 8

ttgcggccgc gtaagaaaaa cttaggata aagttcactt cacgatggaa gacggcaaaa 60
acat 64

<210> 9

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 9

ttgcggccgc gtaagaaaaa cttaggtga atgttactt cacgatggaa gacggcaaaa 60
acat 64

<210> 10

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

tcgcggccgc tattacaatt tggactttcc g 31

<210> 11

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 11
cttagggtga aagtccttg t 21

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 12
acaagggact ttcaccctaa g 21

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 13
tacccatagg tgtggccaaa t 21

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 14
taatacgact cactataggg c 21

<210> 15

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 15
ttttctcact tgggttaatc 20

<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 16
gcactcaciaa gggactttca 20

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: artificially
synthesized primer sequence

<400> 17
gcactcaciaa gggactttat 20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06051

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/86, C12N15/45//A61K31/7105, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/86-15/869, C12N15/45

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICT FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Virus Research, Vol.30(1993) A. Stokes et al., "The complete nucleotide sequence of two cold-adapted, temperature-sensitive attenuated mutant vaccine viruses (cp12 and cp45) derived from the JS strain of human parainfluenza virus type 3 (PIV3)", pp.43-52 Abstract; Fig.2	1 5-9
Y	WO, 97/16538, A1 (DNAVEC RESEARCH INC.), 09 May, 1997 (09.05.97), Claims & AU, 9673351, A & EP, 864645, A1 & CN, 1207123, A & KR, 99067232, A	5-9
PX	Journal of Virology, Vol.73[11] (November, 1999), A. KATO et al., "Sendai Virus Gene Start Signals Are Not Equivalent in Reinitiation Capacity: Moderation at the Fusion Protein Gene", pp.9237-9246	1-9
PX	Virology, Vol.269[1] (March, 2000), M. A. Hoffman et al., "Precise Mapping of the Replication and Transcription Promoters of Human Parainfluenza Virus Type 3", pp.201-211	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 November, 2000 (27.11.00)

Date of mailing of the international search report
05 December, 2000 (05.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10-11

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 10 and 11 pertain to diagnostic methods aiming at therapy to be practiced on the human body which comprise transferring virus vectors into hosts including humans, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06051

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 97/16539, A1 (DNAVEC RESEARCH INC.), 09 May, 1997 (09.05.97), & AU, 9673352, A & EP, 863202, A1 & CN, 1207124, A & KR, 99067271, A	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N15/86, C12N15/45//A61K31/7105, A61K48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12N15/86-15/869, C12N15/45

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
MEDLINE (STN),

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Virus Research, Vol. 30(1993) A. Stokes et al. "The complete nucleotide sequence of two cold-adapted, temperature-sensitive attenuated mutant vaccine viruses (cp12 and cp45) derived from the JS strain of human parainfluenza virus type3 (PIV3)" p. 43-52 要約及び第2図参照	1 5-9
Y	WO, 97/16538, A1 (株式会社ディナベック研究所) 9. 5月. 1997 (09. 05. 97) 特許請求の範囲参照 &AU, 9673351, A &EP, 864645, A1 &CN, 1207123, A &KR, 99067232, A	5-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 00

国際調査報告の発送日

05.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇

4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 10-11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲10-11に係る発明はヒトを含む宿主に対してウイルスベクターを導入することによる、治療を意図した人体の処置方法に該当するから、特許協力条約第17条(2)(a)(i)及び特許協力条約に基づく規則39.1(iv)の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Journal of Virology, Vol. 73[11] (1999-Nov) A. Kato et al. "Sendai Virus Gene Start Signals Are Not Equivalent in Reinitiation Capacity: Moderation at the Fusion Protein Gene" p. 9237-9246	1-9
PX	Virology, Vol. 269[1] (2000-Mar) M. A. Hoffman et al. "Precise Mapping of the Replication and Transcription Promoters of Human Parainfluenza Virus Type 3" p. 201-211	1
A	WO, 97/16539, A1 (株式会社ディナベック研究所) 9. 5月. 1997 (09. 05. 97) &AU, 9673352, A &EP, 863202, A1 &CN, 1207124, A &KR, 99067271, A	1-9

DESCRIPTION

PARAMYXOVIRUSES COMPRISING MODIFIED TRANSCRIPTION START SEQUENCE

5 Technical Field

The present invention relates to recombinant viruses of Paramyxoviridae comprising a modified transcription start sequence.

Background Art

10 Paramyxoviruses have a non-segmented negative strand RNA as the genome. Six genes are coded in the genome, and a short sequence (E-IG-S signal) is commonly linked to each gene. These signal sequences are highly conserved especially within a genus and within a family, and is extremely high among genes of a given virus species
15 (Feldmann, H. E. et al., 1992, Virus Res. 24:1-19).

Sendai virus (SeV), classified into Respirovirus in the family Paramyxoviridae, is an enveloped, non-segmented negative-strand RNA virus that is considered to be the prototype for the subfamily Paramyxovirinae. The SeV genome is 15,384 bases in size, starting
20 with a short 3' leader region, followed by six genes encoding the N (nucleocapsid), P (phospho), M (matrix), F (fusion), HN (hemagglutinin-neuraminidase) and L (large) proteins, and ending with a short 5' trailer region. In addition to the P protein, the second gene expresses the accessory V and C proteins by a process
25 known as co-transcriptional editing that inserts a G residue not comprised in the template (Park, K.H. and M. Krystal, 1992, J. Virol. 66:7033-7039; Paterson, R.G., and R.A. Lamb, 1990, J. Virol. 64:4137-4145; Thomas, S.M. et al., 1988, Cell, 54:891-902; Vidal, S. et al., 1990, J. Virol. 64:239-246) and by alternative
30 translational initiations, respectively (Gupta, K. C., and E. Ono, 1997, Biochem. J. 321:811-818; Kuronati, A. et al., 1998, Genes Cells 3:111-124). The genome is tightly associated with the N protein, forming a helical ribonucleoprotein (RNP) complex. This RNP, but not the naked RNA, is the template for both transcription and
35 replication (Lamb, R.A., and D. Kolakofsky, 1996, *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. pp.1177-1204. In *Fields Virology*,

3rd edn. Fields, B. N., D. M. Knipe, and P. M. Howley et al. (ed.), Raven Press, New York, N. Y.). There is only a single promoter at the 3' end for viral RNA polymerase comprising the P and L proteins (Hamaguchi, M. et al., 1983, *Virology* 128:105-117). By recognizing the short, conserved transcription end (E) sequence and transcription start (S) sequence at each gene boundary, the polymerase produces leader RNA and each of the mRNAs (Glazier, K. et al., 1997, *J. Virol.* 21:863-871). There is a trinucleotide intergenic (IG) sequence between the E sequence and S sequence, which is not transcribed (Gupta, K. C., and D. W. Kingsbury, 1984, *Nucleic Acids Res.* 12:3829-3841; Luk, D. et al., 1987, *Virology* 160:88-94). Since the efficiency of reinitiating transcription at each gene boundary is high but not perfect, the transcripts from the downstream genes are less abundant than those from the upstream genes. Therefore, each mRNA is not synthesized in equimolar quantities in infected cells, but there is a polar attenuation of transcription toward the 5' end (Glazier, K. et al., 1997, *J. Virol.* 21:863-871; Homann, H. E. et al., 1990, *Virology* 177:131-140; Lamb, R.A., and D. Kolakofsky, 1996, *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. pp.1177-1204. In *Fields Virology*, 3rd edn. Fields, B. N., D. M. Knipe, and P. M. Howley et al. (ed.), Raven Press, New York, N. Y.).

After the translation of the mRNAs and accumulation of translation products, genome replication takes place. Here, the same viral RNA polymerase conducts replication using the same RNP template, but now somehow ignores the respective E sequence and S sequence of each mRNA and generates a full length antigenomic positive sense (+)RNP (Lamb, R.A., and D. Kolakofsky, 1996, *Paramyxoviridae: The viruses and their replication*. pp.1177-1204. In *Fields Virology*, 3rd edn. Fields, B. N., D. M. Knipe, and P. M. Howley et al. (ed.), Raven Press, New York, N. Y.). The polymerase enters the promoter at the 3' end of (+)RNP to generate genomic (-)RNP, which serves as the template for the next round of transcription and replication.

The E sequence (3'-AUUCUUUUUU-5' in the genomic negative sense) is completely conserved among the six genes in the SeV genome. The

five U residues in the latter half are thought to allow the polymerase slippage-generating poly(A). In contrast, the S sequences are slightly varied and are generalized as 3'-UCCCWVUUWC-5' (Gupta, K. C., and D. W. Kingsbury, 1984, *Nucleic Acids Res.* 12:3829-3841).

5 Specifically, the S sequence is UCCCACUUUC for P, M and HN genes, UCCCAGUUUC for N gene, UCCCuaUUUC for F gene, and UCCCACUUaC for L gene. Identical differences are seen in all SeV strains sequenced to date, regardless of differences in isolation procedure, passage history, and virulence for the natural host such as mice, suggesting

10 that the variations are locus-specific. It is possible that these differences arise as a result of nucleotide accumulation in sites that are unaffected by variations in the S sequence. Another possibility is that these differences arise due to nucleotide substitutions at important sites of the signal and the selection of

15 viruses that have acquired the ability to regulate the expression of each gene during viral evolution.

Up to now, several studies with model template systems of various nonsegmented negative strand RNA viruses have indicated that the S sequences are indeed critical for transcriptional initiation,

20 but sequence variations are tolerated to some extent (Barr, J. N. et al., 1997, *J. Virol.* 71:1794-1801; Barr, J.N. et al., 1997, *J. Virol.* 71:8718-8725; Hwang, L.N. et al., 1998, *J. Virol.* 72:1805-13; Kuo, L. et al., 1996, *J. Virol.* 70:6143-6150; Rassa, J. C., and G. D. Parks, 1998, *Virology*, 247: 274-286; Stillman E. A., and M. A.

25 Whitt, 1998, *J. Virol.* 72: 5565-5572). Certain nucleotide substitutions in these S sequences were shown to decrease transcription initiation efficiency, suggesting that gene expression is also modulated by naturally occurring variations in the viral life cycle. (Kuo, L. et al., 1996, *J. Virol.* 70:6892-6901;

30 Kuo, L. et al., 1997, *J. Virol.* 71:4944-4953; Stillman E. A., and M. A. Whitt, 1997, *J. Virol.* 71:2127-2137). However in the model template systems, all events required early in the natural life cycle like primary transcription is by-passed by the successive and constant supply of *trans*-acting proteins (Nagai, Y. Paramyxovirus

35 replication and pathogenesis. Reverse genetics transforms understanding. *Rev. Medical. Virol.* 9(2): 83-99 (1999)). The

transcription and replication of minigenomes are uncoupled in these systems. T7 polymerase -expressing vaccinia virus often used to produce *trans*-acting proteins masks the subtle effects of mutations by, for example, posttranscriptional modifications by capping enzymes encoded by vaccinia viruses. In addition, transfection efficiencies might not be equal throughout the whole experiment (Bukreyev, A. et al., 1996, J. Virol. 70:6634-6641; He, B. et al., 1997, Virology 237:249-260). Namely, effects of nucleotide substitutions in the S sequence on transcription initiation cannot be accurately examined in model template systems. Thus, to comprehensively evaluate the roles of S sequence and E sequence, it was necessary to introduce mutations into the full-length viral genome.

15 Disclosure of the Invention

An objective of the present invention is to provide virus vectors of Paramyxoviridae in which the S sequence has been modified so as to modify the expression of genes located downstream thereof, a method for producing the vectors as well as uses thereof.

20 The present inventors have already succeeded in constructing a system to produce infectious SeV by manipulating their genomes using recombinant DNA techniques. The use of this system enables the regeneration of negative strand RNA viruses based on their corresponding DNA, and to perform reverse genetics of SeV by manipulating various genes of the infectious virus (Kato, A. et al., 25 1997, EMBO J. 16: 578-587; Kato, A. et al., 1997, J. Virol. 71: 7266-7272; Kuo, L. et al., 1996, J. Virol. 70: 6892-6901; Nagai, Y., 1999, Rev. Medical. Virol. 9: 83-99; Sakaguchi, T. et al., 1997, Virology 235: 360-366). Using this system, the present inventors have attempted to elucidate the significance of heterogeneity found in the S sequences of SeV.

Newly synthesized E sequence and S sequence were ligated to the upstream of the firefly luciferase gene, and this was inserted to the downstream of the noncoding region of the N gene. The S sequences 35 were designed to have same sequence as the four naturally-occurring variations described above. In the constructed recombinant virus,

the N mRNA transcription starts by its own S sequence and stops by the synthetic E sequence within the inserted reporter (luciferase) gene. The reporter gene expression, which is driven by each of the different S sequences, was quantitated and compared.

5 The results obtained here clearly showed that the natural S sequence for the F gene had a significantly lower reinitiation activity than the other three S sequences. When *de novo* protein synthesis is blocked and genome replication is inhibited, only transcription occurs, and replication does not. By conducting
10 experiments under such conditions, it was confirmed that the reduced luciferase gene expression by the F specific signal was indeed caused primarily at the transcriptional level, and was not a secondary result of replication (Fig. 4). This experiment further showed that the reinitiation activity driven by the S sequence of F gene
15 was approximately one forth of that of the other three.

 The reinitiation capacity of different S sequences was then assessed by replacing the natural S sequence of the F gene with that of P/M/HN genes having a higher reinitiation efficiency and by examining replication capability of the recovered virus (SeV/mSf)
20 in cultured cells, *in ovo*, and in mice. As a result, the inventors found that the replaced S sequence enhances not only F gene expression, but also the expression of downstream genes, again at the transcriptional level (Figs. 7 and 9).

 That is, the present inventors found that the reinitiation
25 activity of S sequence of each gene of viruses belonging to Paramyxoviridae varies from the S sequence. It was also revealed that the substitution of S sequence of a particular gene by another S sequence having a different reinitiation activity enables the modification of expression of not only the gene right after the
30 sequence, but also genes located further downstream of the gene at the transcriptional level, to complete the invention.

 This invention relates to virus vectors of Paramyxoviridae in which a S sequence has been modified so as to modify expression levels of genes located downstream of the S sequence, a method for producing
35 such vectors and the use thereof, more specifically to relates to: (1) a virus vector DNA, wherein the transcription start (S) sequence

of at least one gene on the genome of a virus belonging to Paramyxoviridae has been modified so as to modify the expression level of said gene and genes located downstream thereof within the host,

5 (2) the virus vector DNA according to (1), wherein said modification of the transcription start sequence comprises the substitution of said sequence by the transcription start sequence of another gene of a virus belonging to Paramyxoviridae,

10 (3) the virus vector DNA according to (1), wherein said modification of transcription start sequence comprises the substitution of the transcription start sequence of F gene by the transcription start sequence of another gene,

(4) the virus vector DNA according to (3), wherein said transcription start sequence of another gene comprises that of a P/M/HN gene type,

15 (5) a virus vector DNA according to any one of (1) to (4), wherein said virus vector DNA is defective in F gene and/or HN gene,

(6) a virus vector DNA according to any one of (1) to (5), wherein a foreign gene has been inserted into said virus vector DNA ,

20 (7) a virus vector of Paramyxoviridae comprising a transcription product from a virus vector DNA according to any one of (1) to (6) within virus particles,

(8) the vector according to (7), wherein said vector is a Sendai virus (SeV) vector,

25 (9) the vector according to (7) or (8), wherein the proliferation capability in the host is elevated compared to that of the wild type virus,

30 (10) a method for producing a virus vector of Paramyxoviridae, wherein said method comprises the steps of transferring a virus vector DNA according to any one of (1) to (6) into the host, and expressing the virus protein in said host, and

(11) the method according to (10), wherein said virus of Paramyxoviridae used to produce the vector is Sendai virus.

35 Herein, a "virus vector of Paramyxoviridae" is defined as a vector (or carrier) that is derived from a virus of Paramyxoviridae, and which can transfer a gene to a host cell. The virus vector of Paramyxoviridae of the present invention may be a ribonucleoprotein

(RNP) or a virus particle having infectivity. Here, "infectivity" is defined as the ability of the virus vector to transfer, through its cell adhesion and membrane fusion abilities, the virus genome contained in the virus particles to cells, and to express it.

5 The virus vector of Paramyxoviridae may have a replication capability, or may be a defective vector without the replication capability. Herein, "have a replication capability" is defined as the ability of virus vectors to replicate and produce infective virus particles in host cells infected with the virus vectors.

10 The virus vector of Paramyxoviridae of this invention can carry a foreign gene in an expressible manner. Such virus vectors can be prepared as recombinant virus vectors of Paramyxoviridae. Herein, a "recombinant" virus vector of Paramyxoviridae is defined as one constructed by genetic engineering, or its amplified products. For
15 instance, recombinant virus vectors of Paramyxoviridae can be generated from a recombinant virus cDNA of Paramyxoviridae.

 Herein, a virus of Paramyxoviridae is defined as a virus belonging to the family Paramyxoviridae, or a derivative thereof. The present invention can be applied to, for example, a virus of
20 Paramyxoviridae such as the Sendai virus, Newcastle disease virus, Mumps virus, Measles virus, Respiratory syncytial virus, rinderpest virus, Canine distemper virus, simian parainfluenza virus (SV5), and type I, II, and III human parainfluenza virus. The virus vector and vector DNA of the present invention are preferably derived from a
25 virus of the genus *Paramyxovirus* or a derivative thereof. Viruses of the genus *Paramyxovirus* to which the present invention is applicable include type I parainfluenza viruses including Sendai virus and human HA2, type II parainfluenza viruses including simian SV5 and SV41 and human CA, type III parainfluenza viruses including bovine SF and human
30 HA1, type IV parainfluenza viruses including subtype A and subtype B, Mumps virus, Newcastle disease virus, and many other viruses of the genus *Paramyxovirus*. Most preferably, the virus vector and vector DNA of the invention are derived from the Sendai virus. These viruses may be wild-type strains, mutant strains, laboratory-passaged strains,
35 artificially constructed strains, and so on. Incomplete viruses such as the DI particle (Willenbrink W. and Neubert W. J., J. Virol., 1994,

68, 8413-8417), synthesized oligonucleotides, and so on, may also be utilized as material for generating the virus vector of the present invention.

Herein, "virus vector DNA" means DNA comprising a nucleotide
5 sequence encoding the genome of a virus vector. "DNA" herein includes single-stranded DNA and double-stranded DNA.

Here, the "N, P, M, F, HN, and L genes" of the viruses of Paramyxoviridae represent those encoding the nucleocapsid protein, phosphoprotein, matrix protein, fusion protein,
10 hemagglutinin-neuraminidase, and large protein, respectively. Genes of each virus of the subfamily Paramyxovirinae are described generally as follows. In general, N gene may also be indicated as "NP gene".

	<i>Respirovirus</i>	N	P/C/V	M	F	HN	-	L
	<i>Rublavirus</i>	N	P/V	M	F	HN	(SH)	L
15	<i>Morbillivirus</i>	N	P/C/V	M	F	H	-	L

For instance, the accession numbers in the nucleotide sequence database of each gene of the Sendai virus, are M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, and X17218 for N gene; M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, and X17008 for P gene; D11446,
20 K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, X53056 for M gene; D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, and X02131 for F gene; D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, X56131 for HN gene; and D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, and X58886 for L gene.

25 This invention provides virus vector DNAs in which the S sequence of at least one gene on the genome of a virus belonging to Paramyxoviridae has been modified so as to modify the expression levels of the gene and genes located downstream thereof in the host. Virus vector DNAs of this invention are capable of modifying
30 transcription levels of not only a gene right after the S sequence but also gene(s) downstream thereof, by modifying the S sequence.

"Modification of a transcription start (S) sequence" in this invention refers to carrying out the substitution, deletion, addition and/or insertion of one or more nucleotides in the S sequence
35 of a gene on the genome of a virus belonging to Paramyxoviridae or the substitution of the S sequence of a gene by that of another gene

of a virus belonging to Paramyxoviridae.

The modification of the S sequence to obtain a sequence having a desired reinitiation activity may be carried out by designing a variety of S sequences, and detecting the reinitiation activity using the luciferase assay and such as described in Example 1 to select a sequence having the desired activity. S sequences may be modified by using known genetic engineering techniques. For example, as described in Example 3, any desired mutation can be introduced into the S sequence of the F gene on the genome of a virus belonging to Paramyxoviridae using site-specific mutagenesis.

Virus vectors of Paramyxoviridae according to this invention include those in which a S sequence has been modified so that the expression level of, for example, the F gene is significantly elevated as compared with the wild type virus. Significant elevation refers to an elevation in expression levels, for example, by 20% or more, preferably 40% or more, more preferably 2-fold or more, even more preferably 3-fold or more as compared with the expression of the wild type F gene. Such vectors can be produced, for example, by substituting the S sequence of the F gene by that of P, M, HN, N or L gene. Virus vectors of Paramyxoviridae according to this invention include those in which the expression level of any of P, M, HN, N or L gene, or any combinations thereof is significantly reduced as compared with the expression of the wild type. Significant reduction means a reduction in expression, for example, by 20% or more, preferably 30% or more, more preferably 40% or more, and even more preferably 60% or more as compared with that of the wild type. Such vectors can be produced, for example, by substituting the S sequence of P, M, HN, N and/or L gene by that of F gene. Expression levels of genes can be measured, for example, through the detection of mRNA (transcription product) or proteins (translation product). The gene expression level is measured preferably under conditions that minimize the effect of virus replication rate. For example, as shown in Fig. 3 of Example 1, gene expression level can be measured under conditions in which only one replication cycle takes place, alternatively, as represented in Fig. 4, by specifically estimating the primary transcription through the

detection of RNAs or proteins. These measurements can be carried out, for example, by the methods described in Example 1 or 2.

The present inventors examined the reinitiation activity of 4 different S sequences found in a virus of Paramyxoviridae (Sendai virus), and discovered that the activity was different in each of them and that while the reinitiation activities of the S sequences of L gene (AGGGTGAAT), P/M/HN gene (AGGGTGAAA) and N gene (AGGGTCAAA) showed a high value, the reinitiation activity of the S sequence of F gene (AGGGATAAA) was low. Therefore, when a high reinitiation activity is desired, S sequences of L gene, P/M/HN gene or N gene may be used, while when a low reinitiation activity is preferred, the S sequence of F gene may be used. For example, the substitution of S sequence of F gene by that of P/M/HN gene having a high reinitiation activity can lead to the elevation of transcription levels of F gene and genes located downstream thereof.

There are a variety of advantages of modifying transcription levels of virus genes of Paramyxoviridae. For example, with a virus in which the S sequence of F gene has been substituted by one having a higher reinitiation activity, the viral proliferation capability can be elevated. In addition, by exchanging the S sequence of F gene and that of L gene, it can be expected that only expression levels of F and HN genes would be elevated, leaving the viral proliferation capability unaffected. Furthermore, in the case of a protein whose high expression is undesirable, the expression level of the protein can be restricted by linking the gene thereof to the downstream of the S sequence with a low reinitiation activity, such as that of F gene.

In a viral genome comprising a S sequence modified to have a higher transcription reinitiation activity, the expression level of mRNA encoded by the gene downstream of the modified S sequence is increased compared with the original wild type genome. Accordingly, when a desired foreign gene is located downstream of the modified S sequence, the gene product level is also expected to elevate. Therefore, virus vectors having such genomes are advantageous in that the production efficiency of gene product(s) has been improved. In addition, a virus having such a genome has the advantage of yielding

a large amount of viruses in a short time, when collecting recombinant virus particles or virus-like particles as pharmaceutical compositions or vaccines. For example, it has been known that virus particles incubated at 37°C for 2 days form complexes among them and
5 undergo an aging phenomenon in which their original morphology changes. (Kim, J. et al., Virology 95: 523-535 (1979)). Observation of these under an electron microscope has revealed that the nucleocapsid structure is tightly folded in *de novo* synthesized viral particles, but unfolds and becomes loose with aging. When utilizing
10 viral particles or virus-like particles as pharmaceutical compositions and vaccines, it is important to obtain homogeneous materials. Therefore, it is necessary to recover viruses from a culture as short as possible. As shown in Examples, the present invention may allow the preparation of modified virus having a titer
15 as high as 100-folds as compared with the wild type virus (Fig. 5).

The virus vector of Paramyxoviridae of the present invention includes, for example, vectors that have the replication capability and those that are capable of autonomous proliferation. In general, the genome of the wild type paramyxovirus contains a short 3' leader
20 region followed by six genes encoding N, P, M, F, HN, and L proteins, and has a short 5' trailer region on the other terminus. The vector of the present invention that is able to replicate autonomously can be obtained by designing a genome having a similar structure to that described above. The virus vector of Paramyxoviridae of the invention
25 may have an altered alignment of virus genes, compared with wild type virus.

The virus vector of Paramyxoviridae of the present invention may be defective in any of the genes that are contained in the wild type virus. For instance, in the case of the reconstitution of the
30 Sendai virus vector, proteins encoded by N, P/C, and L genes are thought to be required in *trans*, but the genes may not be a component of the virus vector. In one embodiment, an expression vector carrying genes encoding the proteins may be co-transfected into host cells with another expression vector encoding the vector genome to reconstitute
35 a virus vector. Alternatively, an expression vector encoding the virus genome is transfected into host cells carrying genes encoding

the proteins, and thus a virus vector can be reconstituted by using the proteins provided by the host cell. The amino acid sequence of these proteins may not be identical to those derived from the original virus as long as it has an equivalent or higher activity in nucleic acid transfer, and may be mutated or substituted with that of a homologous gene of another virus.

Proteins encoded by M, F, and HN genes are thought to be essential for cell-to-cell propagation of almost all viruses of Paramyxoviridae. However, these proteins are not required when the virus vector of Paramyxoviridae is prepared as RNP. If genes M, F, and HN are components of the genome contained in RNP, products of these genes are produced when introduced into host cells, and virus particles having infectivity are generated.

RNP can be introduced into cells as a complex formed with lipofectamine, polycationic liposome, and the like. Specifically, a variety of transfection reagents can be used, for instance, DOTMA (Boehringer), SuperFect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER (Boehringer #1811169). Chloroquine may be added to prevent degradation in the endosome (Calos M. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 3015). In the case of replicative viruses, the produced viruses can be amplified or passaged by re-infecting into cultured cells, embryonating hen eggs, or animals (e.g. mammalian such as mice).

Contrastingly, the virus vector of Paramyxoviridae of the present invention may be those lacking the M, F, and/or HN genes. These vectors can be reconstituted by providing deficient gene products exogenously. Such vectors can still adhere to host cells and induce cell fusion as the wild type could. However, daughter virus particles do not have the same infectivity as the original ones because the vector genome introduced into cells lacks one of the above genes. Therefore, these vectors can be safer virus vectors that are capable of only a single gene transfer. For instance, genes deleted from the genome may be F and/or HN genes. Virus vectors defective in F gene can be reconstituted by co-transfection of an expression plasmid encoding the genome of a recombinant virus vector of Paramyxoviridae lacking the F gene (containing virus vector DNA), an expression vector for the F protein, and that for N, P/C, and L proteins into host cells

(PCT/JP00/03194 and PCT/JP00/03195). Alternatively, host cells in which the F gene is integrated into the chromosome may be used. The amino acid sequence of these proteins provided exogenously may not be identical to those of the wild type and may be mutated or replaced by a homologous protein of another virus as long as they provide equivalent or higher gene transfer activity.

The envelope proteins of the virus vector of Paramyxoviridae of the present invention may comprise a protein other than the envelope protein of the original vector genome. There is no limitation on such proteins. These may include envelope proteins of other viruses such as the G protein of the vesicular stomatitis virus (VSV-G). Thus, the virus vector of the invention includes a pseudo type virus vector that has an envelope protein derived from a virus different from the original virus.

Any desired foreign gene, which may or may not encode proteins, can be inserted into the virus vector DNAs of this invention. For example, the foreign gene may encode functional RNA such as a ribozyme or anti-sense RNA. Foreign genes can comprise either naturally-occurring or artificially-designed sequences. For example, in gene therapy and such, a gene for treating an objective disorder is inserted into the virus vector DNA. When virus vector DNAs of this invention are used for manufacturing gene therapy vectors, it is desirable to delete F, HN and/or M genes from the virus vector DNAs so as to suppress their toxicity within the host. In the case of introducing a foreign gene into the DNA of virus vector, for example, in that of Sendai virus vector, it is desirable to insert a sequence comprising a multiple of six nucleotides of the foreign gene between the E sequence and S sequence of the virus vector DNA (J. Virol., Vol. 67, No. 8, 1993, p. 4822-4830), etc. A foreign gene can be inserted before and/or after the respective viral genes (N, P, M, F, HN or L genes). E-I-S sequence (transcription end sequence-intervening sequence-transcription start sequence) or portion thereof is appropriately inserted before or after a foreign gene so as not to interfere with the expression of genes before or after the foreign gene. Expression level of an inserted foreign gene can be regulated by the type of S sequence added to the 5' side (head)

of the foreign gene as well as the site of gene insertion and nucleotide sequences before and after the gene. For example, in SeV, it has been known that the nearer the insertion site to the N gene, the higher the expression level of the inserted gene.

5 Generally, the closer to the 3'-terminus of the negative strand RNA of the virus genome (the closer to N gene in the gene arrangement on the wild type virus genome) the insertion position is, the higher the expression level of the inserted gene will be. To achieve a high expression of a foreign gene, it is preferably inserted into the region
10 near the 3' terminus of the negative stranded genome such as the upstream of the N gene (3' flanking sequence on the minus strand), or between N and P genes. Conversely, the closer to the 5'-terminus of the negative strand RNA (the closer to L gene in the gene arrangement on the wild type virus genome) the insertion position is, the lower
15 the expression level of the inserted gene will be. To reduce the expression of a foreign gene, it may be inserted into the most 5' position on the negative strand, that is, downstream of the L gene in the wild type virus genome (5' flanking region of the L gene on the negative strand) or upstream of the L gene (3' flanking region
20 of L gene on the negative strand). Thus, the insertion position of a foreign gene can be properly adjusted so as to obtain a desired expression level of the gene or optimize the combination of the insert with the virus genes surrounding it. To help the easy insertion of a foreign gene, a cloning site may be designed at the position of
25 insertion. For example, the cloning site may be the recognition sequence of restriction enzymes. The restriction sites in the virus vector DNA can be used to insert a foreign gene. The cloning site may be a multicloning site that contains recognition sequences for multiple restriction enzymes. The vector DNA of the present invention
30 may have other foreign genes at positions other than that used for above insertion.

Recombinant SeV vectors comprising a foreign gene can be constructed as follows according to, for example, the description in "Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587" and "Yu, D. et al.,
35 1997, Genes Cells 2: 457-466".

First, a DNA sample comprising the cDNA nucleotide sequence of

a desired foreign gene is prepared. It is preferable that the DNA sample can be electrophoretically identified as a single plasmid at concentrations of 25 ng/ μ l or more. Below, a case where a foreign gene is inserted to DNA encoding viral genome utilizing NotI site will be described as an example. When NotI recognition site is included in the objective cDNA nucleotide sequence, it is preferable to delete the NotI site beforehand by modifying the nucleotide sequence using site-specific mutagenesis and such method so as not to alter the amino acid sequence encoded by the cDNA. From this DNA sample, the desired gene fragment is amplified and recovered by PCR. To have NotI sites on the both ends of amplified DNA fragment and further add a copy of E-I-S sequence of SeV to one end, a forward side synthetic DNA sequence and reverse side synthetic DNA sequence (antisense strand) are prepared as a pair of primers containing NotI restriction enzyme cleavage site sequence, E-I-S sequence and a partial sequence of the objective gene.

For example, to secure cleavage by NotI, the forward side synthetic DNA sequence is arranged in a form in which any two or more nucleotides (preferably 4 nucleotides excluding GCG and GCC, sequences originating in NotI recognition site, more preferably ACTT) are selected on the 5'-side of the synthetic DNA, NotI recognition site "gcggccgc" is added to its 3'-side, and to the 3'-side thereof, any desired 9 nucleotides or nucleotides of 9 plus a multiple of 6 nucleotides are added as the spacer sequence, and to the 3'-side thereof, about 25 nucleotide-equivalent ORF including the initiation codon ATG of the desired cDNA is added. It is preferable to select about 25 nucleotides from the desired cDNA as the forward side synthetic DNA sequence so as to have G or C as the final nucleotide on its 3'-end.

In the reverse side synthetic DNA sequence, any two or more nucleotides (preferably 4 nucleotides excluding GCG and GCC, sequences originating in the NotI recognition site, more preferably ACTT) are selected from the 5'-side of the synthetic DNA, NotI recognition site "gcggccgc" is added to its 3'-side, and to its further 3'-side, an oligo DNA is added as the insertion fragment to adjust the length. This oligo DNA is designed so that the total

nucleotide number including the NotI recognition site "gcggccgc", complementary sequence of cDNA and EIS nucleotide sequence of SeV genome originating in the virus described below becomes a multiple of six (so-called "rule of six"; Kolakofski, D. et al., J. Virol. 72: 891-899, 1998). Further to the 3'-side of inserted fragment, a sequence complementary to S sequence of Sendai virus, preferably 5'-CTTTCACCCT-3', I sequence, preferably 5'-AAG-3', and a sequence complementary to E sequence, preferably 5'-TTTTTCTTACTACGG-3', is added, and further to the 3'-side thereof, about 25 nucleotide-equivalent complementary sequence counted in the reverse direction from the termination codon of the desired cDNA sequence the length of which is adjusted to have G or C as the final nucleotide, is selected and added as the 3'-end of the reverse side synthetic DNA.

PCR can be done according to the usual method with, for example, ExTaq polymerase (Takara Shuzo). Preferably, PCR is performed using Vent polymerase (NEB), and desired fragments thus amplified are digested with NotI, then inserted to NotI site of the plasmid vector pBluescript. Nucleotide sequences of PCR products thus obtained are confirmed with a sequencer to select a plasmid having the right sequence. The inserted fragment is excised from the plasmid using NotI, and cloned to the NotI site of the plasmid carrying the genomic cDNA. Alternatively, it is also possible to obtain the recombinant Sendai virus cDNA by directly inserting the fragment to the NotI site without the mediation of the plasmid vector pBluescript.

By transferring a virus vector DNA of this invention into host cells to express it therein, it is possible to prepare a virus vector comprising a transcription product from the virus vector DNA within virus particles. Specifically, a virus vector DNA of this invention may be transferred into host cells to express a viral protein within the host cells. Transfer of the virus vector DNA into host cells may precede the expression of viral proteins inside the host cells or *vice versa*, or these processes may be simultaneously carried out. Viral proteins can be expressed inside host cells by transferring, for example, expression vectors encoding the viral proteins to the host. When a virus vector DNA is made defective in F, HN and/or M

genes, infectious virus particles are not formed with such a defective vector. However, it is possible to form infectious virus particles by separately transferring these defective genes, genes encoding other viral envelope proteins, and such, to host cells and
5 expressing them therein.

Methods for transferring virus vector DNA into cells include the following: 1) the method of preparing DNA precipitates that can be taken up by objective cells; 2) the method of preparing a DNA comprising complex which is suitable for being taken up by objective
10 cells and which is also not very cytotoxic and has a positive charge, and 3) the method of instantaneously boring on the objective cellular membrane pores wide enough to allow DNA molecules to pass through by electric pulse.

In Method 2), a variety of transfection reagents can be utilized, examples being DOTMA (Boehringer), SuperFect (QIAGEN #301305), DOTAP, DOPE, DOSPER (Boehringer #1811169), etc. An example of Method 1) is a transfection method using calcium phosphate, in which DNA that entered cells are incorporated into phagosomes, and a sufficient amount is incorporated into the nuclei as well (Graham, F. L. and Van
20 Der Eb, AJ., 1973, Virology 52: 456; Wigler, M. and Silverstein, S., 1977, Cell 11: 223). Chen and Okayama have investigated the optimization of the transfer technique, reporting that suitable DNA precipitates can be obtained under the conditions where 1) cells are incubated with DNA in an atmosphere of 2 to 4% CO₂ at 35°C for 15 to
25 24 h, 2) circular DNA with a higher precipitate-forming activity than linear DNA is used, and 3) DNA concentration in the precipitate mixture is 20 to 30 µg/ml (Chen, C. and Okayama, H., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 2745). Method 2) is suitable for a transient transfection. An old method is known in the art in which a DEAE-dextran (Sigma
30 #D-9885, M.W. 5 x 10⁵) mixture is prepared in a desired DNA concentration ratio to perform the transfection. Since most of the complexes are decomposed inside endosomes, chloroquine may be added to enhance transfection effects (Calos, M. P., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 3015). Method 3) is referred to as electroporation,
35 and is more versatile compared to methods 1) and 2) because it doesn't have cell selectivity. Method 3) is the to be efficient under

optimal conditions for pulse electric current duration, pulse shape, electric field potency (gap between electrodes, voltage), conductivity of buffers, DNA concentration, and cell density.

Among the above-described three categories, transfection reagents (method 2)) are suitable in this invention, because method 2) is easily operable, and facilitates the examining of many test samples using a large amount of cells. Preferably, SuperFect (QIAGEN #301305) or DOSPER (Boehringer #1811169) is used.

Reconstitution of a virus from cDNA can be performed according to the known methods (WO97/16539; WO97/16538; Durbin A. P. et al., *Virol.*, 1997, 235, 323-332; Whelan S. P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 8388-8392; Schnell M. J. et al., *EMBO J.*, 1994, 13, 4195-4203; Radecke F. et al., *EMBO J.*, 1995, 14, 5773-5784; Lawson N. D. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92, 4477-4481; Garcin D. et al., *EMBO J.*, 1995, 14, 6087-6094; Kato A. et al., *Genes Cells*, 1996, 1, 569-579; Baron M. D. and Barrett T., *J. Virol.*, 1997, 71, 1265-1271; Bridgen A. and Elliott R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 15400-15404). These methods enable the reconstitution of virus vectors of Paramyxoviridae including the parainfluenza virus, measles virus, rinderpest virus, and Sendai virus vectors from DNA.

For example, simian kidney-derived LLC-MK2 cells are cultured in 24-well to 6-well plastic culture plates or 100 mm diameter culture dish using a minimum essential medium (MEM) containing 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (100 units/ml penicillin G and 100 µg/ml streptomycin) to 70 to 80% confluency, and infected, for example, with recombinant vaccinia virus vTF7-3 expressing T7 polymerase at 2 PFU/cell. This virus can be inactivated by a UV irradiation treatment for 20 min in the presence of 1 µg/ml psoralen (Fuerst, T. R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8122-8126, 1986; Kato, A. et al., *Genes Cells* 1: 569-579, 1996). Amount of psoralen added and UV irradiation time can be appropriately adjusted. One hour after the virus adsorption, the cells are transfected with 2 to 60 µg, more preferably 3 to 5 µg, of the above-described recombinant SeV cDNA by the lipofection method and such using plasmids (24 to 0.5 µg of pGEM-N, 12 to 0.25 µg of pGEM-P and 24 to 0.5 µg of pGEM-L, more preferably 1 µg of pGEM-N, 0.5 µg of pGEM-P and 1 µg of pGEM-L) (Kato,

A. et al., Genes Cells 1: 569-579, 1996) expressing trans-acting viral proteins required for the production of full-length SeV genome together with SuperFect (QIAGEN). The transfected cells are cultured in a serum-free MEM containing 100 µg/ml each of rifampicin (Sigma) and cytosine arabinoside (AraC) if desired, more preferably only containing 40 µg/ml of cytosine arabinoside (AraC) (Sigma), and concentrations of reagents are set at optima so as to minimize cytotoxicity due to the vaccinia virus and maximize the reconstitution rate of the virus (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1, 569-579). After culturing for about 48 to 72 h following the transfection, the cells are reconstituted, disrupted by repeating three cycles of freezing and thawing, transfected to LLCMK2 cells, and cultured. After culturing the cells for 3 to 7 days, the culture solution is collected. Virus vectors defective in the envelope protein-encoding gene without replication capability can be reconstituted by using LLCMK2 cells expressing envelope proteins for transfection, or transfecting together with an envelope-expressing plasmid. Defective virus vectors can be amplified by culturing the transfected cells overlaid on LLCMK2 cells expressing envelope proteins (PCT/JP00/03194 and PCT/JP00/03195). Virus titer contained in the culture supernatant can be determined by measuring the hemagglutination activity (HA), which can be assayed by "endo-point dilution method" (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1, 569-579). Virus stock thus obtained can be stored at -80°C without the aging.

The type of host cells used for virus reconstitution is not particularly limited, so long as virus vector can be reconstituted therein. For example, in the reconstitution of SeV vector and such, culture cells such as simian kidney-derived CVI cells and LLCMK2 cells, hamster kidney-derived BHK cells, human-derived cells, and so on can be used. To obtain SeV vector in a large quantity, the vector can be amplified by infecting virus vector obtained from the above-described host cells into embryonated hen eggs. Methods for manufacturing virus using hen eggs have been already developed (Nakanishi, et al. (eds.), 1993, "Shinkei-kagaku Kenkyu-no Sentan-gijutu Protocol III (High Technology Protocol III of

Neuroscience Research), Molecular Neurocyte Physiology, Koseisha, Osaka, pp.153-172). Specifically, for example, fertilized eggs are placed in an incubator and incubated for 9 to 12 days at 37 to 38°C to grow embryos. Virus vector is inoculated into chorioallantoic cavity of eggs, and cultured for several days to proliferate the virus. Conditions such as culture duration may be varied depending on the type of recombinant virus used. Subsequently, chorioallantoic fluid comprising the virus is recovered. Separation and purification of SeV vector can be performed according to the standard methods (Tashiro, M., "Virus Experiment Protocols", Nagai and Ishihama (eds.), Medicalview, pp. 68-73 (1995)).

Also, the virus vector of the invention may have on the surface of its envelope adhesion molecules, ligands, receptors, or fragments thereof so as to adhere to specific cells. If vectors comprising a chimeric protein having these proteins in its extracellular domain and a polypeptide derived from the virus envelope protein in its intracellular domain, and such are prepared, it enables the production of a vector targeting a particular tissue. These factors may be encoded by the virus genome itself, or supplied at the time of virus reconstitution through expression of genes other than virus genome (for example, another expression vector or host cell chromosome).

The virus genes contained in the recombinant virus vector may be modified, for example, to reduce antigenicity or enhance RNA transcription efficiency or replication efficiency. Specifically, it is possible to modify at least one of the N, P/C, and L genes, which are genes of replication factors, to enhance transcription or replication. It is also possible to modify the HN protein, a structural protein having hemagglutinin activity and neuraminidase activity, to enhance the virus stability in blood by weakening the former activity and to regulate infectivity by modifying the latter activity. It is also possible to modify the F protein, which is implicated in membrane fusion, to regulate the fusion ability of membrane-fused liposomes. Furthermore, it is possible to generate a virus vector of Paramyxoviridae that is engineered to have weak antigenicity through analyzing the antigen presenting epitopes and such of possible antigenic molecules on the cell surface such as the F protein and

HN protein.

In preparing defective virus vectors, two different virus vectors defective in a different envelope gene may be transfected into the same cell. In this case, each defective envelope protein is supplied through expression from the other complex, and this mutual complementation permits the generation of infective virus particles, which can replicate and propagate. Thus, two or more of the virus vectors of the present invention may be simultaneously inoculated in a combination that complement each other, thereby producing a mixture of each envelope defective virus vector at a low cost and in a large scale. Because such viruses lacking an envelope gene have a smaller genome, they can allow the insertion of a long foreign gene. In addition, it is difficult for these viruses, which are intrinsically non-infective, to keep the status of co-infection after being diluted outside cells, and thus they are sterilized and less harmful to the environment.

In applying a virus vector thus obtained to gene therapy, it is possible to express a foreign gene with which treatment effects are expected, or an endogenous gene the supply of which is insufficient in a patient's body, by either direct or indirect (ex vivo) administration of the virus vector. There is no particular limitation in the type of the foreign gene, which may be, in addition to nucleic acids encoding proteins, nucleic acids that do not encode a protein such as an antisense or ribozyme. There is no particular limitation on the type of proteins encoded by foreign genes, and examples of natural proteins are hormones, cytokines, growth factors, receptors, enzymes, peptides, etc. These proteins can be secretory proteins, membrane proteins, cytoplasmic proteins, nucleoproteins, etc. Examples of artificial proteins are fusion proteins such as chimeric toxins, dominant negative proteins (including soluble molecules of receptors or membrane-binding dominant negative receptors), deletion-type cell adhesion molecules and cell surface molecules. These proteins may be those to whom a secretion signal, membrane localization signal, nuclear localization signal, etc., has been added. It is also possible to suppress functions of undesirable genes expressed in kidney cells by expressing an antisense RNA

molecule or RNA-cleaving ribozyme, etc. Objects of gene therapy to which administratable vectors of this invention can be applied may include cancer therapy achieved by expressing, for example, a gene causing cell death such as a suicide gene (HSV tk, etc.) which exhibits toxicity to infected cells. Another example is preventive therapy for coronary artery restenosis due to arterial sclerosis. In addition, the application of a virus vector of this invention in gene therapy that aims at maintaining cell survival may include the supplementation of gene products of genes such as adenosine deaminase gene (ADA), cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene (CFTR), and so on, which have been known to be deleted or defective in monogenic disorders, etc.

Regardless of whether the aim of gene therapy is to cause cell death or maintain cell survival, vectors of this invention comprising RNA as the genome can be applied to a wide range of disorders, because they are not converted into DNA during transcription and self-replication processes thereof, and also because they are unlikely to be incorporated into chromosomes of reproductive cells, and such, to affect genes of the succeeding generations. That is, vectors of this invention can be applied to disorders caused by many genes, such as hypertension, diabetes mellitus, asthma, ischemic heart disease, and so on, treatments and prevention for many healthy subjects, such as vaccines, and vaccination to prevent various infectious diseases such as AIDS, malaria, influenza, etc.

The virus vector of the present invention can be made as a composition together with a desired, pharmaceutically acceptable carrier. Herein, a "pharmaceutically acceptable carrier" is defined as those materials that can be administered with a vector, but does not inhibit gene transfer by the vector. For instance, the virus vector of this invention may be appropriately diluted with physiological saline, phosphate buffered saline (PBS), and so on to make a composition. If the virus vector of the invention is propagated in hen eggs, and such, the composition may contain a chorioallantoic fluid. Also, the composition may contain carriers such as deionized water or a 5% dextrose aqueous solution. It may further contain stabilizers, antibiotics, or the like. The virus vector-containing composition

of the invention can be administered to any mammals including humans, monkeys, mice, rats, rabbits, sheep, cattle, dogs, etc.

Brief Description of the Drawings

5 Figure 1 shows construction of the plasmid pSeV18c(+) and insertion of the luciferase gene into the downstream region of N ORF. An 18 nucleotide-fragment designed to contain a NotI site was inserted between 1698 and 1699 nucleotides from the 3' end of SeV genome in pSeV(+) by site-directed mutagenesis (Shioda, T. et al.,
10 1983, Nucleic Acids Res. 11:7317-7330). The resulting plasmid encoding the SeV antigenome with the 18 nucleotides-insertion was named pSeV18c(+). The ORF of the luciferase gene was PCR-amplified with 4 sets of NotI-tagged primers (ESn/NotLr, ESp/NotLr, ESf/NotLr and ES1/NotLr) from the template plasmid, pHvLuc-RT4 (Kato, A. et
15 al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579) to generate the fragments containing each of the different natural S sequences placed at the head of the luciferase gene. These amplified fragments were digested with NotI, and introduced into the same site of pSeV18c(+). The resulting plasmids, named pSeV(+)SnLuc, pSeV(+)SpLuc,
20 pSeV(+)SfLuc and pSeV(+)SlLuc, were used to recover the recombinant SeV/SnLuc, SeV/SpLuc, SeV/SfLuc and SeV/SlLuc, respectively.

Figure 2 shows gene construction of SeV.

Figure 3 shows luciferase expression of SeV/SpLuc, SeV/SnLuc, SeV/SfLuc and SeV/SlLuc. The recombinant viruses were inoculated
25 to CV1 cells at an moi of 10 (pfu/cell). The luciferase activities were measured at the times (hr) indicated.

Figure 4 is a photograph and graph showing luciferase expression of recombinant SeV. The recombinant viruses were inoculated to CV1 cells at an moi of 100 (pfu/cell). The cells were
30 cultured in the presence of cycloheximide for 12 hr. Portions of cells were harvested to prepare RNA and probed with the luciferase probe (top). The remaining of cells was additionally incubated for 0, 2 and 4 hrs without cycloheximide to allow the protein synthesis and luciferase activity was measured (bottom).

35 Figure 5 shows growth kinetics of SeV/mSf. The titers of the wild-type SeV and mutant SeV/mSf were measured at the time points

indicated under single-cycle conditions. Open bars and filled bars represent hemagglutination units (HAU) of wild-type and mutant viruses, respectively. Lines with open and filled circles represent pfu per ml of the wild-type and mutant viruses, respectively.

5 Figure 6 is a photograph showing cytopathogenicity of SeV/mSf. CV1 cells were infected with the wild-type or SeV/mSf virus at an moi of 20 (pfu/cell) in the presence (+) and absence (-) of trypsin. The pictures were taken 48 hr post infection

10 Figure 7 is a photograph showing intracellular expression of viral genes. CV1 cells infected with the wild-type SeV or SeV/mSf virus were analyzed by Northern hybridization with the viral N, P, F or L gene probes at various times (hrs) post infection. The positions of mRNAs and genomic/antigenomic RNA (vRNA) are marked.

15 Figure 8 is a photograph showing intracellular expression of viral genes. Intracellular expression of viral genes in CV1 cells was analyzed on Western blotting with anti-SeV antibody at various times (hrs) indicated at the top of each lane.

20 Figure 9 is a photograph showing intracellular expression of viral genes. CV1 cells were infected with wild-type SeV and SeV/mSf at moi of 100 pfu in the presence of cycloheximide. RNAs were extracted after 12 hr inoculation and analyzed by Northern hybridization. The specific bands obtained were analyzed using the BAS 2000 Image Analyzer.

25 Figure 10 is a photograph showing competition assays of the wild-type SeV and SeV/mSf in serial copassages. (A) The specific primer sets (left) to detect either of viral RNAs (right). (B) Each passage was initiated with input doses of 10^4 (SeV/mSf) and 10^4 (wild-type SeV) pfu/egg or 10^4 (SeV/mSf) and 10^2 (wild-type SeV) pfu/egg. The chorioallantoic fluids were harvested every 3 days, 30 diluted to 10^{-6} and co-inoculated into new eggs serially up to 10 passages. Viral RNAs were extracted and analyzed by one-step RT-PCR method using the specific primer sets. Passage number is shown on the top of each lane. "Wild-type" and "SeV/mSf" represent DNA fragments amplified by using specific primer sets for respective 35 sequences.

Figure 11 shows body weight gain of normal BALB/c and thymus

deficient BALB/c (nu/nu) mice infected with the wild-type SeV and SeV/mSf viruses. Five mice were inoculated intranasally with various doses of viruses (10^4 to 10^7 pfu per mouse). The weight gain of mice were measured in grams every day up to 14 days post inoculation.

5 Dead mice are marked by †.

Figure 12 shows pulmonary lesions and viral loads in the lungs of BALB/c and BALB/c (nu/nu) mice. Each mouse was intranasally inoculated with 10^4 pfu of the viruses. These mice were sacrificed at 0, 1, 2, 3, 5, 7 and 9 days post inoculation to grade lesion scores (top) and to determine virus titers in the lungs (bottom). All these values are individually shown for each mouse.

Best Mode for Carrying out the Invention

The present invention will be explained in detail below with reference to examples, but it is not to be construed as being limited thereto.

[Example 1] Construction of recombinant viruses and luciferase assay

The nine nucleotides of the SeV E sequence are conserved exactly among all genes. On the other hand, there are minor differences in the nine nucleotides of S sequence. While S sequence of three (P, M and HN) of six genes are 3'-UCCCACUUU-5', that of N, F and L gene are 3'-UCCCAGUUU-5', 3'-UCCCuaUUU-5', and 3'-UCCCACUUa-5', respectively (Fig. 2). These minor differences are completely conserved in all strains of SeV regardless of the passage history, virulence and isolation strategy. To examine the role of these minor differences of S, the inventors created the four recombinant SeVs named SeV/SpLuc, SeV/SnLuc, SeV/SfLuc and SeV/SlLuc expressing the luciferase under the control of synthetic S sequence.

30 1-1. Creation of an insertion site after the N ORF

The plasmid pSeV(+) contained the cDNA copy of full-length SeV antigenome (Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579) was used as the starting material for plasmid construction. In order to insert a luciferase gene having synthetic E sequence and S sequence, a unique NotI site was created at downstream of N ORF in N gene. Eighteen nucleotides (5'-gagggcccgccgcccga-3'/SEQ ID NO: 1)

containing NotI restriction site was inserted between 1698 and 1699 nucleotides from the 3' end of SeV genome which was located within the 5' non-coding (in negative sense) region of N gene as shown in Fig. 1 (Shioda, T. et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11:7317-7330).

5 For the insertion, the inventors used site-directed mutagenesis by a PCR-mediated overlap primer extension method (Ho, S. N. et al., 1989, Gene 77:51-59) essentially according to the previous paper (Hasan, M. K. et al., 1997, J. Gen. Virol. 78:2813-2820). Briefly, two primers (NmF; 10 5'-gagggcccgcgccgcga¹⁶⁹⁹TACGAGGCTTCAAGGTACTT¹⁷¹⁸-3'/SEQ ID NO:2 and NmR; 5'-tcgcggccgcgggccctc¹⁶⁹⁸TGATCCTAGATTCCTCCTAC¹⁶⁷⁰-3'/SEQ ID NO: 3) with overlapping 18 nucleotides ends, and two outer primers (OP1, 5'-⁶¹CAAAGTATCCACCACCCTGAGGAGCAGGTTCCAGACCCTTTGCTTTGC¹⁰⁵-3'/SEQ ID NO: 4 and OP2, 5'-²⁴⁶⁷TTAAGTTGGTVAGTGACTC²⁴⁴⁹-3'/SEQ ID NO: 5) were 15 synthesized. First PCRs were performed with the OP1/NmF primer pairs and the OP2/NmF primer pairs using the pSeV(+) as a template to gave rise to 1.6 Kb- and 0.8 Kb-fragments, respectively. Second PCR was then performed with OP1/OP2 primer pairs using the purified 1.6 Kb- and 0.8 Kb-fragments as the template to generate the single 20 2.4 Kb-fragment with the 18 nucleotides. The 2.4 Kb-fragment was purified and digested with SphI and SalI. The plasmid pSeV(+) was cut at the positions of 610 and 2070 on the SeV genome by these enzymes. The sequence of the resulting 1.47 Kb-fragment was verified by sequencing using an AFLII automated DNA sequencer (Pharmacia, 25 Uppsala) and replaced with the corresponding fragment of parental pSeV(+), thus generating pSeV18c(+) containing an unique (sole) restriction site after the N ORF.

Like parental plasmid pSeV(+), recombinant viruses can be reconstituted from thus obtained plasmid having an 18-nucleotied 30 insert containing an NotI restriction site. The infectivity and replication capability of the generated viruses were also similar to those of the parental pSeV(+).

1-2. Insertion of luciferase gene regulated by various S sequences into vector

35 The luciferase gene from the firefly (*Photinus pyralis*) derived from the pHVlucRT4(-) (Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579).

was amplified by PCR with the following four primer pairs corresponding to the four different S sequences; four forward primers (ESp;

5'-TTgcggccgcGTAAGAAAACTTAGGGTGAAAGTTCACCTTCACGATGGAAGACGGCAAAAA

5 CAT-3'/SEQ ID NO: 6, ES_n;

5'-TTgcggccgcGTAAGAAAACTTAGGGTCAAAGTTCACCTTCACGATGGAAGACGGCAAAAA

CAT-3'/SEQ ID NO: 7, ES_f;

5'-TTgcggccgcGTAAGAAAACTTAGGGatAAAGTTCACCTTCACGATGGAAGACGGCAAAAA

CAT-3'/SEQ ID NO: 8, and ES_l;

10 5'-TTgcggccgcGTAAGAAAACTTAGGGTGAAtGTTCACTTCACGATGGAAGACGGCAAAAA

CAT-3'/SEQ ID NO: 9) and one common reverse primer (NotLr;

5'-TCgcggccgcTATTACAATTTGGACTTCCG-3'/SEQ ID NO: 10). Underlined

are a new set of SeV E sequence and S sequence connected with the conserved intergenic trinucleotide and the lower case letters

15 without underline represent the NotI restriction site. The lower case letters with underline represent each of the unique nucleotides

in the primers. The 1.7 Kb-fragments amplified with the primer pairs of ES_p/NotLr, ES_n/NotLr, ES_f/NotLr and ES_l/NotLr were purified,

digested with NotI and directly introduced into the NotI site of pSeV18c(+) (Fig. 1). The final constructs were named pSeV(+)SpLuc,

20 pSeV(+)SnLuc, pSeV(+)SfLuc and pSeV(+)SlLuc, respectively, according to the S sequence used.

1-3. Virus recovery from cDNAs

Viruses were recovered from cDNAs essentially according to the

25 previously described procedures (Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579). Briefly, 2 x 10⁶ of LLCMK2 cells in 6 cm diameter plate

were infected with vaccinia virus (VV), vTF7-3, a gift of Dr. B. Moss (Fuerst, T. R. et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8122-8126),

at moi of 2 PFU/cell. Then, 10 µg of the parental or mutated pSeV(+) and the plasmids encoding *trans*-acting proteins, pGEM-N (4 µg),

30 pGEM-P (2 µg) and pGEM-L (4 µg) (Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579) were transfected simultaneously with the aid of the

lipofection reagent DOTAP (Boehringer-Mannheim, Mannheim). The cells were maintained in serum free MEM in the presence of 40 µg/ml

35 araC (1-β-D-arabinofuranosylcytosine) and 100 µg/ml rifampicin to minimize VV cytopathogenicity and thereby maximize the recovery rate.

Forty hours after transfection, cells were harvested, disrupted by three cycles of freezing and thawing and inoculated into 10-day-old embryonated hen eggs. After 3 days of incubation, the chorioallantoic fluid was harvested. The titers of recovered viruses were expressed in hemagglutination units (HAU) and PFU/ml as described previously (Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579). The helper VV contaminating the chorioallantoic fluid of the eggs, containing 10^8 to 10^9 pfu/ml of the recovered SeVs, was eliminated by the second propagation in eggs at a dilution of 10^{-7} . This second passaged fluids, stored at -80°C , were used as the seed virus for all the experiments.

1-4. Cell cultures and virus infection

Monkey kidney-derived cell lines LLCMK2 and CV1, were grown in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C . Monolayer cultures of these cells were infected with the mutant viruses recovered from cDNAs at an input moi of 10 PFU/cell, and maintained in serum-free MEM. The wild-type SeV (Z strain) recovered from the cDNA (Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579) was used as a control.

It was found that the four recombinant viruses had replicated more slowly than the wild type in CV1 cells probably because of accommodating an extra gene as long as 1,728 nucleotides (Hasan, M. K. et al., 1997, J. Gen. Virol. 78:2813-2820). Among the four recombinants, SeV/SfLuc has replicated most slowly.

1-5. Luciferase assay

Luciferase activities expressed from the recombinant SeVs were compared with each other. The expression of luciferase activity from SeV was studied in 5×10^5 cells/well of CV1 cells in 6-well plates at various input multiplicities from 1 to 300 pfu per cell. Under the single-cycle growth conditions, cells were harvested at 0, 6, 14, 20 and 26 hrs post infection (p.i.). The luciferase activity of harvested cells was measured by a luciferase assay kit (Promega, Madison) with a luminometer (Luminos CT-9000D, Dia-Iatron, Tokyo) as described before (Hasan, M. K. et al., 1997, J. Gen. Virol. 78:2813-2820; Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579).

The luciferase activities expressed from SeVs increased in

accordance with the infection time and infective dose in all recombinants. Figure 3 shows changes of luciferase activity when the viruses were infected at moi 10 to CV1 cells.

These cells were collected, and Northern hybridization was performed by using luciferase cDNA as probe. Northern hybridization was conducted as follows. RNAs were extracted from the cells using TRIzol (Gibco BRL, N.Y.). The RNAs were ethanol precipitated, dissolved in formamide/formaldehyde solution, then electrophoresed in 0.9% agarose-formamide/MOPS gels, and capillary transferred onto Hibond-N filters (Amersham, Buckinghamshire). The filters were probed with ³²P-labeled probes made by the multi-prime labeling kit (Amersham, Buckinghamshire). For the luciferase probe, the NarI/HincII (1270 bp) fragment was purified from pHvLucRT4 (Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579). It was verified that the luciferase mRNAs are synthesized as monocistronic mRNAs.

These data unequivocally demonstrated that the synthetic E sequence and S sequence inserted just before the luciferase ORF are correctly recognized by the viral RNA polymerase. However, there were differences in luciferase activities in the cells infected with these four viruses even under same condition. The highest activity was obtained with SeV/SlLuc and the lowest activity with SeV/SfLuc at 26 hr p.i. (Fig. 3). SeV/SpLuc and SeV/SnLuc were slightly lower than SeV/SlLuc at 26 hr p.i. However, this was not seen at 14 and 20 hrs p.i. Thus, the reinitiation capacities of Sp, Sn and Sl were regarded to be comparable.

[Example 2] Comparison of primary transcription amounts from recombinant viruses

To see whether or not the differences of the expression amounts among four recombinant SeVs observed in Example 1 were primarily brought about at the level of transcription, but not in the replication process, CV1 cells infected with the recombinants were incubated in the presence of cycloheximide, which inhibits protein synthesis and hence, blocks viral replication requiring *de novo* viral protein synthesis. Under these conditions, only the viral primary transcription catalyzed by the virion-associated RNA polymerase is

allowed.

In a similar manner as in Example 1, CV1 cells were infected with the recombinant viruses at an m.o.i. of 100, and the infected cells were incubated in the presence of 100 µg/ml cycloheximide (Sigma, St. Louis) for 12 h. The RNA in infected cells was prepared as described above, and the Northern hybridization was performed using the luciferase cDNA as the probe (Fig. 4, top). A different batch of cells was incubated to synthesize proteins in the absence of cycloheximide for 0, 2 and 4 h, and the luciferase activity was measured.

As a result, in all cells infected with any recombinant virus, it was found that the longer the incubation period was after cycloheximide removal, the higher the luciferase activity was. However, the luciferase expression of SeV/SfLuc-infected cells was again significantly lower than the other three (Fig. 4, bottom). The amounts of luciferase mRNA in each of the virus-infected cells correlated well with the activities of luciferase. The luciferase activities at 4 hr incubation were normalized by the count of SeV/SpLuc, as this type of S sequence is shared with three of the six genes. Luciferase activities in SeV/SnLuc- and SeV/SlLuc-infected cells were 0.86 and 1.19, respectively, and thus nearly comparable to that in SeV/SpLuc. In contrast, the value of SeV/SfLuc-infected cells reached only 0.24 of the control.

These results strongly suggested that the signal used for F gene expression possesses a lower reinitiation potential than the other S sequences.

[Example 3] SeV mutant comprising a modified S sequence for the F gene

The results described above suggested that there is a down-regulation of transcription at the F gene in the natural genome context of SeV. To investigate this, the inventors next created mutant SeV, SeV/mSf, whose S sequence of the F gene was replaced with that of the P/M/HN gene, as described below and compared its replication with that of the wild-type.

3-1. Mutagenesis to modify the S sequence of F gene in full-length

SeV cDNA

Two nucleotides substitutions were performed on the S sequence of F gene as follows. First, pSeV(+) was cleaved by BanIII at the SeV portions of 2088 and 5333 in SeV genome, and the resulting 3.4 Kb-fragment was recloned into the same restriction site of pBluescript KS(+) (Stratagene, La Jolla) to make a pB/BanIII. Then, site-directed mutagenesis by a PCR-mediated overlap primer extension method (Ho, S. N. et al., 1989, Gene 77:51-59) was performed as described above using synthesized two primers (mGS1F; 5'-⁴⁸¹⁰CTTAGGGTGAAAGTCCCTTGT⁴⁸³⁰-3'/SEQ ID NO: 11 and mGS1R; 5'-⁴⁸³⁰ACAAGGGACTTTCACCCTAAG⁴⁸¹⁰-3'/SEQ ID NO: 12) and two outer primers (M1F, 5'-³⁹³¹TACCCATAGGTGTGGCCAAAT³⁹⁵¹-3'/SEQ ID NO: 13 and T7, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3'/SEQ ID NO: 14). Underlined letters are the mutagenized points. The first PCRs performed with M1F/mGS1R primer pairs and T7/mGS1F primer pairs using the pB/BanIII as a template yielded 0.9 Kb- and 0.6 Kb-fragment, respectively. These two fragments were purified, and the second PCR was then performed with M1F/T7 primer pairs using the purified fragments as the templates, generating a single 1.5 Kb-fragment with the two nucleotides mutations. This fragment was purified and digested with BanIII and recloned into the same restriction site of pSeV(+) to make a pSeV(+)mSf. The cloned sequence was verified by nucleotide sequencing. Viruses were reconstituted from the cDNA by the same procedures as Example 1.

The proliferation of this virus was examined using CV1 cells. The SeV/mSf was found to grow faster than the wild-type SeV in CV1 cells (Fig. 5). In the absence of trypsin, round cells and detached cells were observed. In the presence of exogenous trypsin to proteolytically activate the F glycoprotein, fused cells were observed more for the SeV/mSf than for the wild-type (Fig. 6).

3-2. Expression of SeV/mSf genes

The mRNA levels in CV1 cells infected with the wild-type and SeV/mSf at moi = 10 were analyzed by Northern blotting like Example 1 at various hours p.i. For the Sendai virus N probe, the PstI/PvuI (1189 bp) fragment was purified from the pGEM-N and used. For P probe, 792 bp of SmaI/SmaI fragment was purified from the pGEM-P and used.

For M, F, HN and L probes, the NdeI/NdeI (878 bp), BamHI/BamHI (902 bp), ScaI/ScaI (1108 bp) and BamHI/BamHI (1654 bp) fragments were purified from pSeV(+) and used, respectively.

As shown in Fig. 7, the F and L transcripts from SeV/mSf were detected earlier and reached remarkably higher levels, compared with the wild-type infection. The P and N transcripts were also detected earlier in SeV/mSf infection, although the peak levels were comparable to the wild-type.

In order to confirm viral protein expression in infected cells, Western blotting was performed by using anti-SeV antibody. CV1 cells (2×10^5) grown in 6-well plates were infected at a moi of 10 with the wild-type or SeV/mSf and harvested various hrs post infection. The cells were centrifuged, and the cell pellets were lysed and run in 12.5% SDS-PAGE (Laemmli, U.K., 1970, Nature 227:680-685) and analyzed by Western blotting with anti SeV rabbit serum as described (Kato, A. et al., 1995, Virology 209:480-488; Kato, A. et al., 1996, Genes to Cells 1: 569-579). As a result, the levels of F₀ protein in the SeV/mSf-infected cells were significantly higher than in the wild-type (Fig. 8) at any time point throughout infection. The downstream gene products, HN and L, were not well resolved in this experiment.

To compare the level of transcription directly, after the cells infected with either wild-type SeV or SeV/mSf were treated with cycloheximide to block *de novo* protein synthesis, RNAs were extracted from the cells and analyzed by Northern hybridization as above. The radioactivities of viral genomic RNA contained in hybridized bands were analyzed by using the BAS 2000 Image Analyzer (Fujifilm, Tokyo). Enhanced expression of the F and L genes, but not of the N and P gene, was also clearly seen in mutant SeV (Fig. 9). These results again unequivocally demonstrated that the S sequence naturally occurring for the F gene transcription possesses a lower reinitiation activity and hence down-regulates the expression of F and downstream genes. Therefore, it was also shown that transcription level of not only F gene but also downstream genes thereof can be elevated by replacing the S sequence of the F gene with one having high efficiency. Probably because of enhanced L gene expression in the SeV/mSf, the virion (v)

RNA levels were higher for the mutant than for the wild-type throughout infection (Fig. 7). Earlier detection of mRNAs in the mutant SeV infected cells as demonstrated in Fig. 7 might be also due to the increased L gene expression.

5

[Example 4] Successive co-passages of the wild-type SeV and SeV/mSf in embryonated hen eggs

Although the wild-type SeV replicated slower than SeV/mSf in CV1 cells under single-cycle conditions as shown in Fig. 5, the possibility still remained that, when cultured slowly at multiple-cycle conditions, the naturally occurring down-regulation of transcription for the F and downstream genes would be more advantageous than the artificially introduced up-regulation. The inventors thus examined whether either the wild-type SeV or SeV/mSf would compete out the other under the multiple-cycle conditions of successive co-passages of the two viruses in eggs.

The SeV/mSf and wild-type SeV were co-inoculated into two embryonated hen eggs with the respective doses of both 10^4 pfu/egg ($10^4:10^4$ inoculation), and in another experiment, 10^4 and 10^2 pfu/egg ($10^4:10^2$ inoculation). Every three days post inoculation, the chorioallantoic fluids were harvested and after dilution to 10^{-6} , 0.1 ml of this was reinoculated into new eggs. These reinoculations were successively repeated 10 times. Viral RNAs were extracted from each chorioallantoic fluid by using TRIzol/LS (Gibco BRL, N.Y.) as Example 1, and amplified by one-step RT-PCR with two sets of specific primers. The viruses grown in the chorioallantoic fluids were semi-quantitatively measured by RT-PCR with specific primer pairs. One primer pair was designed to amplify only fragments having wild-type S sequence for the F gene (AGGGatAAAG), and the other mutant sequence (AGGGtgAAAG) (Fig. 10A). Specifically, the RNA was extracted from 25 μ l of each chorioallantoic fluid, and reverse transcribed with HvM primer (5'-⁴⁴⁴⁸TTTCTCACTTGGGTAAATC⁴⁴⁶⁷-3'/SEQ ID NO: 15) at 50°C for 30 min using Superscript II (Gibco BRL, N.Y.), and were heat denatured at 94°C for 2 min. The cDNAs were amplified by PCR with HvM and GS2WR (5'-⁴⁸³⁶GCACTCACAAGGGACTTTca⁴⁸¹⁷-3'/SEQ ID NO: 16) primers for SeV/mSf and with HvM and GS2MR

(5'-⁴⁸³⁶GCACTCACAAGGGACTTTat⁴⁸¹⁷-3'/SEQ ID NO: 17) primers for wild-type SeV as described previous (Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587; Kuronati, A. et al., 1998, Genes Cells 3:111-124). The lower case letters represent the mutated dinucleotides. The
 5 respective specific products were analyzed by electrophoresis in agarose gel as described.

It was found that the wild-type genome had disappeared by the eighth passage in the case of 10⁴:10⁴ inoculation and by fifth passages following 10⁴:10² inoculation (Fig. 10B). In control experiments,
 10 each virus was individually passaged and the genome sequences were determined. The results indicated that both of the viral genomes were stably maintained during 10 successive passages without any nucleotide change in the regions sequenced. These data indicated that the naturally occurring F gene S sequence conferred no
 15 replication advantage on SeV at least *in ovo* under the multiple-cycle conditions.

[Example 5] Virulence of SeV/mSf in mice

Highly complicated conditions are required for exhibiting
 20 virulence of SeV in natural host mice at individual level, compared with cultured cells or eggs. Whether the mutant SeV/mSf replicates earlier than the wild-type and shows stronger virulence in mice was examined.

Specific pathogen-free (SPF), 3-week-old of mice BALB/c and
 25 4-week old of nude mice BALB/c (nu/nu) were purchased from Charles-River, Japan and used for virus infection experiments. These mice were infected intranasally with 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ or 10⁸ pfu/mouse of the wild-type or SeV/mSf under mild anesthetization with ether (Kiyotani, K. et al., 1990, Virology 177:65-74). Their body
 30 weights were individually measured every day up to 14 days. At 0, 1, 3, 5, 7 and 9 days post infection, three mice in each group were sacrificed and the virus titers in the lungs were measured for BALB/c and nude mice inoculated with 10⁴ pfu. Pulmonary lesions were scored at the same time (Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16:578-587). The
 35 results are shown in Fig. 11.

The mouse body weight gain was strongly disturbed by 10⁷ pfu

of both virus inoculations. All mice were killed by either virus at similar days p.i. At 10^6 pfu significant differences were found between the two viruses. SeV/mSf more strongly affected the body weight gain compared with the wild-type. The former killed all mice while the latter killed only one and allowed the remaining mice to gain the weight again. At 10^5 pfu, all mice infected with the wild-type showed a pattern of weight gain nearly comparable to that of the mock infected mice, and survived, while those infected with the mutant SeV/mSf did not and half of the mice died. Thus, SeV/mSf was clearly more virulent than the wild-type. The difference in virulence was quantitated by 50% lethal dose (LD_{50}); the LD_{50} was 1.78×10^6 pfu for the wild-type and 7.94×10^4 pfu for the mutant (Table 1). The mutant virus was thus 22 times more virulent than the wild-type for BALB/c strain.

Table 1. LD_{50} of wild-type and mutant viruses in normal and nude mice

Inoculation		BALB/C	LD_{50}	BALB/C(nu/nu)	LD_{50}
Wild-type	10^8	5/5 ^a	1.78×10^6	NT	3.16×10^6
	10^7	5/5		3/5	
	10^6	1/4		2/5	
	10^5	0/5		NT	
	10^4	0/5		0/5	
SeV mS/F	10^8	5/5	7.94×10^4	NT	7.94×10^4
	10^7	5/5		5/5	
	10^6	5/5		5/5	
	10^5	3/5		3/5	
	10^4	0/5		0/5	

^a Dead individuals/Inoculated individuals

Cytotoxic T lymphocytes (CTL) modulate SeV pathogenesis in two different ways. They contribute to eliminating or clearing the virus from body on one hand, and on the other, accelerate disease progression by immunopathological processes. That is, experimental results in BALB/c mice indicate the possibility of indirect exacerbation due to an enhanced immuno response induced by the mutant.

SeV, rather than direct effects resulting from a high reproducibility of the mutant SeV in the mouse body. Therefore, in an attempt to deny the possibility of aggravated pathogenicity resulting from an induced immunity, pathogenicities of the wild type and mutant viruses were compared in thymus-deficient nude mice (Fig. 11). The LD₅₀ values of each virus were comparable for nude mice and for the parental normal mice, and a similar difference (to 40 fold) between the two viruses was found for the nude mice (Table 1). These results suggested that CTL did not play a major role in pathogenesis of both wild-type and mutant viruses during the observation period (14 days) at least on the bases of LD₅₀. However, both the wild-type and mutant viruses persisted in the lungs of nude mice throughout, while cleared in the parental mice (Fig. 12). These results suggest that CTL and other thymus-dependent responses play at least partial roles in the virus pathology.

From the above-described results, it has been indicated that the natural S sequence of the F gene partially suppresses the replication of SeV so as to allow infected mice to survive for a longer time.

Industrial Applicability

The present invention provides virus vectors of Paramyxoviridae S sequences of which have been modified. In the virus vectors of this invention, S sequences have been modified so that transcription levels of genes on the genome have been modified compared to the wild type virus. These viruses are useful for elevating the virus proliferation capability and expression of a desired foreign gene. Such virus vectors are advantageous in improving the production efficiency of gene products. In contrast, in the case of proteins too high expressions of which are undesirable, it is possible to suppress expression levels of genes encoding the proteins by linking the genes to the downstream of the S sequence with the reduced reinitiation activity, such as the S sequence of F gene. In addition, when recombinant virus particles or virus-like particles are recovered as pharmaceutical compositions or vaccines, viruses having a genome in which the S sequence has been modified

to elevate the proliferation capability are advantageous in being capable of yielding a large amount of viruses in a short time.

CLAIMS

1. A virus vector DNA, wherein the transcription start (S) sequence of at least one gene on the genome of a virus belonging to Paramyxoviridae has been modified so as to modify the expression level of said gene and genes located downstream thereof within the host.
2. The virus vector DNA according to claim 1, wherein said modification of the transcription start sequence comprises the substitution of said sequence by the transcription start sequence of another gene of a virus belonging to Paramyxoviridae.
3. The virus vector DNA according to claim 1, wherein said modification of transcription start sequence comprises the substitution of the transcription start sequence of F gene by the transcription start sequence of another gene.
4. The virus vector DNA according to claim 3, wherein said transcription start sequence of another gene comprises that of a P/M/HN gene type.
5. A virus vector DNA according to any one of claims 1 to 4, wherein said virus vector DNA is defective in F gene and/or HN gene.
6. A virus vector DNA according to any one of claims 1 to 5, wherein a foreign gene has been inserted into said virus vector DNA.
7. A virus vector of Paramyxoviridae comprising a transcription product from a virus vector DNA according to any one of claims 1 to 6 within virus particles.
8. The vector according to claim 7, wherein said vector is a Sendai virus (SeV) vector.
9. The vector according to claim 7 or 8, wherein the proliferation capability in the host is elevated compared to that of the wild type virus.
10. A method for producing a virus vector of Paramyxoviridae, wherein said method comprises the steps of transferring a virus vector DNA according to any one of claims 1 to 6 into the host, and expressing the virus protein in said host.
11. The method according to claim 10, wherein said virus of Paramyxoviridae used to produce the vector is Sendai virus.

ABSTRACT

The present invention provides virus vectors of the family Paramyxoviridae in which the transcription start (S) sequence has
5 been modified so as to modify the expression of genes located downstream thereof, a method for producing the vectors, and uses thereof. By measuring the transcription initiation efficiency of the S sequence of each gene carried by Sendai viruses (SeV), it was clarified that the S sequence of F gene has a significantly lower
10 ability to promote transcription than the other three S sequences. When the S sequence of the F gene of wild type Sendai virus was substituted by the S sequence of the P/M/HN gene-type showing a high transcription initiation efficiency, the F gene of the resultant Sendai virus mutant and genes located downstream thereof show
15 elevated expression levels. It was also revealed that this mutant proliferates more quickly than the wild type. The vectors of this invention are useful in elevating the expression of foreign genes and producing pharmaceutical compositions and vaccines.